

TỔNG LUẬN 8-2017.

SINH HỌC TỔNG HỢP

Giới thiệu

I. Các khái niệm về sinh học tổng hợp

- 1.1. Định nghĩa
- 1.2. Phân biệt sinh học tổng hợp
- 1.3. Những giới hạn đối với “kỹ thuật sửa bộ phận sinh học”

II. Sự sống tổng hợp

- 2.1. Tổng quan các con đường dẫn tới sự sống tổng hợp
- 2.2. Xây dựng tế bào mới
- 2.3. Xây dựng hệ thống sinh học từ các bộ phận

III. Các ứng dụng của sinh học tổng hợp:

- 3.1. Sinh học tổng hợp ở vi sinh vật
- 3.2. Sinh học tổng hợp với các loài khác
- 3.3. Sinh học tổng hợp trong các loài thực vật

IV. Đánh giá rủi ro và quản lý rủi ro

- 4.1. Các phương pháp đánh giá rủi ro hiện tại
- 4.2. Khả năng áp dụng các phương pháp hiện tại lên cây trồng được tạo ra bằng bộ gen tổng hợp
- 4.3. Đánh giá hậu quả thực tế và rủi ro của việc phóng thích vào môi trường thực vật được tạo ra bằng bộ gen tổng hợp
- 4.4. Những cân nhắc về an toàn sinh học đối với các Khối ghép Sinh học (BioBricks) được sử dụng cho sinh học tổng hợp

Kết luận

Tài liệu tham khảo chính

GIỚI THIỆU

Sinh học tổng hợp và di truyền tổng hợp là những lĩnh vực nghiên cứu nổi bật đang thu hút sự quan tâm do tiềm năng to lớn của chúng trong nhiều ứng dụng phong phú đa dạng. Nhờ những tiến bộ công nghệ, trong những năm gần đây, thế giới đã và đang thành công trong việc giảm chi phí và dễ dàng hơn trong việc giải trình bộ gen và kích hoạt hay chỉnh sửa gen.

Công nghệ sinh học nói chung và sinh học tổng hợp nói riêng là một trong những động lực quan trọng của cuộc cách mạng công nghiệp lần thứ Tư. Sinh học tổng hợp sẽ giúp chúng ta có khả năng tùy biến cơ thể bằng cách sửa lại ADN. Đặt những vấn đề đạo đức qua một bên, sự phát triển của sinh học tổng hợp không chỉ tác động sâu và ngay tức thì về y học và còn về nông nghiệp và năng lượng.

Chuyên đề này giới thiệu tổng quan hiện trạng liên quan đến các định nghĩa và khung khái niệm, cho thấy sự đa dạng của các chủ thể tiềm năng được đặc trưng bởi các nền tảng cơ sở và phương pháp tiếp cận. Ngoài các thực tế nghiên cứu và phát triển, đánh giá về các ứng dụng tiềm năng, các phương pháp về đánh giá rủi ro và thực hành quản lý rủi ro cũng là vấn đề được quan tâm.

Nhằm cung cấp hình ảnh tổng quát về một lĩnh vực có tiềm năng phát triển to lớn, Cục Thông tin khoa học và công nghệ quốc gia xin giới thiệu tổng luận "Sinh học tổng hợp" giúp bạn đọc có thể có thể hiểu rõ hơn về những tiềm năng và những thách phát triển của lĩnh vực khoa học này. Do sinh học tổng hợp bao hàm nhiều lĩnh vực nghiên cứu chuyên sâu và nhiều khái niệm mới, công việc biên soạn không tránh khỏi những thiếu sót, ban biên tập mong bạn đọc thông cảm và đóng góp ý kiến để hoàn thiện những chuyên đề sau này.

Xin trân trọng giới thiệu.

**CỤC THÔNG TIN KHOA HỌC VÀ
CÔNG NGHỆ QUỐC GIA**

I. CÁC KHÁI NIỆM VỀ SINH HỌC TỔNG HỢP

1.1. Định nghĩa

Sinh học tổng hợp là một lĩnh vực mới nổi có tiềm năng cung cấp vô số khả năng và ứng dụng tiềm năng. Nó tích hợp nhiều lĩnh vực nghiên cứu khác nhau từ kỹ thuật đến khoa học cơ bản cùng hướng tới một mục tiêu đã được xác định trước. Các cuộc thảo luận liên quan đến định nghĩa về sinh học tổng hợp cho thấy chưa có sự phối hợp toàn cầu trong lĩnh vực này. Do đó, cho đến nay vẫn chưa có một định nghĩa nào được chấp nhận rộng rãi về sinh học tổng hợp. Đơn giản, sinh học tổng hợp có thể được xem như việc áp dụng các nguyên lý kỹ thuật vào các thành phần cơ bản của sinh học, một giải thích do Nhóm chuyên gia cao cấp về Khoa học và công nghệ mới và đang nổi lên đề xuất (EC 2005):

"Sinh học tổng hợp là kỹ thuật sinh học: tổng hợp các hệ thống phức tạp, dựa trên sinh học (hoặc lấy cảm hứng), có các chức năng không tồn tại trong tự nhiên. Quan điểm kỹ thuật này có thể được áp dụng ở tất cả các cấp bậc của các cấu trúc sinh học - từ các phân tử riêng lẻ đến toàn bộ tế bào, các mô và các sinh vật. Về bản chất, sinh học tổng hợp sẽ cho phép thiết kế 'hệ thống sinh học' một cách hợp lý và có hệ thống."

Theo sự mô tả này, các mục tiêu của sinh học tổng hợp là cải tiến có hệ thống các hệ thống sinh học hiện có và tạo ra những hệ thống mới (Arpino và cộng sự, 2013). Với ý tưởng này, sinh học tổng hợp được đặc trưng bởi một định nghĩa kép, một mặt nhằm mục đích tạo các bộ phận sinh học mới (như promoter (vùng gen khởi động), terminator (vùng gen kết thúc), các khung đọc mở¹), các thiết bị (kết hợp các bộ phận) và các hệ thống (các thực thể sinh học, từ các cấu trúc sinh học cho đến các sinh vật), và mặt khác, để tái thiết kế các bộ phận hiện có (Porcar và Pereto 2012).

Sinh học tổng hợp theo đuổi việc khiến cho can thiệp kỹ thuật hệ thống sinh học dễ dàng hơn và dự đoán được nhiều hơn. Xuất phát từ khoa học cơ bản, các thành phần sinh học có đặc điểm tốt được cung cấp, từ đó tạo ra các bộ phận mô đun chuẩn. Những phần mô-đun/phân tử này là các axit nucleic và các protein, và mục đích là lắp ráp chúng theo cách dự đoán được hành vi của chúng. Chúng được sử dụng để thiết kế các protein có chức năng mới, để tạo ra các mạch gen (các bộ phận sinh học được thiết kế để thực hiện các chức năng logic cụ thể) hoặc các gen tổng hợp. Thiết kế (thiết kế lại) một hệ thống bao gồm các tham số phiên mã, biến đổi và sau biến đổi và các phương pháp kỹ thuật kiểm soát và tối ưu tiêu chuẩn để tìm ra sự lựa chọn thông số tốt nhất để đạt được một mục tiêu mong muốn. Giống như các lĩnh vực kỹ thuật khác, các hệ thống tiêu chuẩn có thể được tạo nên từ các thiết bị tiêu chuẩn, nghĩa là các kết hợp chức năng của các bộ

¹ Trong di truyền học phân tử, một khung đọc mở (open reading frame -ORF) là một phần của khung đọc có tiềm năng được dịch. Một ORF là một đoạn liên tục các codon (đơn vị mã) có chứa một codon bắt đầu và một codon kết thúc.

phần, và do đó được tạo ra từ bộ phận tiêu chuẩn (hoặc các cấu thành). Rõ ràng, tiêu chuẩn hóa là một điều kiện tiên quyết cho các nỗ lực kỹ thuật, các kết quả sẽ được xác minh bằng cách kết hợp mô phỏng và các phương pháp phân tích.

Thiết kế và tạo ra các bộ phận sinh học mới để tạo ra các hệ thống di truyền sinh học theo mô đun là một khía cạnh quan trọng của sinh học tổng hợp. Các điều kiện tiên quyết cơ bản của cách tiếp cận sinh học tổng hợp là có đầy đủ dữ liệu về gen, protein và chất chuyển hóa, giảm chi phí và tăng hiệu quả tổng hợp oligonucleotide, và sự phát triển của các kỹ thuật chính xác để nghiên cứu chuyển hóa tế bào. Các công nghệ đột phá để sử dụng hiệu quả và thành công sinh học tổng hợp là, chẳng hạn như, cải tiến tổng hợp ADN, những tiến bộ trong việc lập trình ADN thông lượng cao và mô hình hoá mạng lưới tín hiệu và trao đổi chất quy mô lớn. Ngoài ra, cần phải có những hiểu biết chi tiết về tế bào chủ (gọi là "khung"), đặc tính kỹ thuật của các bộ phận, hành vi chức năng và khả năng tương thích của chúng và khả năng lắp ráp nhiều chuỗi ADN.

Bức tranh khoa học về sinh học tổng hợp

Oldham (2012) đã đưa ra hình ảnh khái quát giúp chúng ta hiểu về sinh học tổng hợp bằng cách phân tích các bài báo nghiên cứu, các thuật ngữ chính, phân bố các nhà nghiên cứu và các tổ chức theo khu vực, lập bản đồ các đối tượng và các trích dẫn. Nghiên cứu này cung cấp cơ sở cho các nghiên cứu liên quan và kết luận rằng - tại thời điểm xuất bản - gần 700 tổ chức ở 40 quốc gia đã tiến hành nghiên cứu về các thành phần, bộ phận và sinh vật di truyền có tiềm năng cho nhiều ứng dụng. Nghiên cứu này cũng chứng minh một cách ấn tượng rằng một trong những đặc điểm chính của sinh học tổng hợp là sự giao thoa/liên ngành giữa sinh học, kỹ thuật hóa học, hóa học, kỹ thuật điện, vật lý và khoa học máy tính.

Sinh học tổng hợp sử dụng các nguyên lý kỹ thuật mô đun, mô tả đặc tính (in vitro, in vivo, các bộ phận tham chiếu trong các điều kiện khác nhau) và tiêu chuẩn hoá. Nhiều phương pháp và kỹ thuật được sử dụng trong ngữ cảnh này bắt nguồn từ các lĩnh vực khác. Sinh học tổng hợp áp dụng kiến thức từ nhiều ngành khác nhau như sinh học phân tử, hóa học, công nghệ sinh học, công nghệ thông tin và kỹ thuật. Các khoa học cơ bản cho sinh học tổng hợp bao gồm hệ gen (genomics), sinh học cấu trúc, hóa sinh, sinh học hệ thống, sinh học phân tử và tế bào, sinh hóa, kỹ thuật và thiết kế protein, và kỹ thuật mô và vật liệu sinh học. Công nghệ nền tảng là một bộ công cụ và phương pháp có thể được áp dụng trên nhiều lĩnh vực. Các hệ thống tiêu chuẩn được xây dựng từ các thiết bị

“Sinh học tổng hợp là một tập hợp các hoạt động nghiên cứu giao thoa giữa kỹ thuật, mô hình máy tính, và khoa học sinh học. Nó được dựa trên nhiều công nghệ và công cụ khác nhau bao gồm những tiến bộ trong sắp xếp ADN, các công nghệ tổng hợp gen rẻ hơn, năng lực tính toán cao hơn và hiểu biết tốt hơn về các hệ thống sinh học.”

(Polizzi, 2013)

chuẩn được tạo nên từ các bộ phận tiêu chuẩn (hoặc các thành phần, trong trường hợp này là dãy ADN có các đặc tính nhất định).

Việc tổng hợp các bộ gen mới theo nghĩa thực tế có thể so sánh với một dự án xây dựng phải giảm thiểu lỗi, và các bộ gen tổng hợp có thể hỏng trong giai đoạn thiết kế, tổng hợp hoặc trong quá trình khởi động (nghĩa là quá trình cấy ghép vào vật chủ mới). Các lỗi thiết kế là quan trọng nhất, vì thiết kế mới có thể thất bại do sự hiện diện của các gen độc hại, sự vắng mặt của các gen thiết yếu, hoặc kiểm soát gen không phù hợp (Wang 2010). Tuy nhiên, các lỗi này sẽ chỉ thể hiện sau khi tổng hợp.

Các nhà sinh học tổng hợp ban đầu đã tạo ra các mạch điều tiết gen đơn giản với động năng được mô tả bằng các mô hình toán học đơn giản. Một "quy trình kỹ thuật" được thiết lập kết hợp thiết kế định lượng, xây dựng vật lý, đo lường thực nghiệm và gỡ lỗi dựa trên giả thuyết.

Thách thức lớn của sinh học tổng hợp là sự tập trung của công nghệ sinh học chuyên từ các gen riêng lẻ sang toàn bộ bộ gen. Mặc dù có những tiến bộ quan trọng, nhưng việc thiết kế và xây dựng bộ gen để tạo ra kiểu hình mong muốn là cực kỳ khó khăn, vì các kiểu hình cần phải được tiên đoán chính xác từ kiểu gen. Kỹ thuật thay đổi bộ gen nhằm mục đích xây dựng một kiểu gen dẫn đến một kiểu hình mong muốn, cách tiếp cận này đòi hỏi phải xác định số lượng các thay đổi phải được thực hiện cho một bộ gen hiện có. Theo Esvelt và Wang (2013), cách tiếp cận về hệ gen liên quan đến việc sửa đổi trình tự cho ít nhất hai vùng riêng biệt của bộ gen. Cách tiếp cận này đòi hỏi các công cụ thiết kế bộ gen tinh vi, và thiết kế bộ gen cần những mô hình tiên đoán mạnh mẽ.

Kỹ thuật điều chỉnh toàn bộ bộ gen bao gồm tổng hợp bộ gen *Mycoplasma mycoides*, thiết kế các cánh tay nhiễm sắc thể tổng hợp không có các yếu tố không ổn định trong nấm men, hoặc thiết kế lại một nhiễm sắc thể III có chức năng đầy đủ, loại bỏ tất cả các yếu tố có thể gây ra sự bất ổn.

Hiện tại, việc tổng hợp mới bộ gen trên quy mô lớn đòi hỏi khắt khe hơn việc chỉnh sửa bộ gen hiện có và có thể thất bại ngay cả do những sai sót nhỏ trong các gen cần thiết. Tuy nhiên, đó là phương pháp được lựa chọn cho những thay đổi lớn hơn. Trong bất kỳ trường hợp nào, phương pháp tiếp cận hiện nay bao gồm việc xây dựng và thử nghiệm từng bước trung gian (sắp xếp trình tự gen thông lượng cao, các thử nghiệm kiểu hình và chức năng) để kiểm tra xem các mục tiêu thiết kế đã được đáp ứng hay không.

Thiết kế thành công nhằm vào một mục tiêu cụ thể dưới các điều kiện ràng buộc khác nhau (tức là bối cảnh), cần đạt được bằng cách xác định một bộ quy cách. Mặc dù có những thành công gần đây trong việc dự đoán hành vi từ kiểu gen đến kiểu hình, sự phức tạp sinh học, biến thể tổ hợp, và giới hạn tính toán đã hạn chế mô hình tiên đoán. Sự phức tạp sinh học được cho là một trong những rào cản quan trọng nhất đối với việc thiết

kế hệ gen hợp lý. Phương pháp phân tích thực nghiệm dự đoán dựa vào mô phỏng máy tính và phương pháp sắp xếp trình tự gen thế hệ tiếp theo có thể góp phần vào các thiết kế di truyền. Một cách tiếp cận để thu thập dữ liệu phù hợp là đột biến ở cấp bộ gen. Các kỹ thuật đột biến khác bao gồm tái tổ hợp, zinc-finger nucleases, transcription activator-like (TAL) effector nucleases, CRISPR nucleases ... đều đã có, nhưng các kỹ thuật thích hợp cho kỹ thuật bộ gen đa kênh vẫn đang được phát triển. Esvelt và Wang (2013) đã đề xuất Kỹ thuật Hệ genome Tự động Multiplex (MAGE) sử dụng một oligo để chỉnh sửa chính xác các địa điểm trong bộ gen.

1.2. Phân biệt sinh học tổng hợp

Sinh học tổng hợp và Gen tổng hợp

Sinh học tổng hợp hiện vẫn chưa thống nhất được quan điểm để có thể được định nghĩa chính xác. Mặc dù đã có một số thống nhất chung dùng để phân biệt sinh học tổng hợp với công nghệ sinh học, kỹ thuật tái tổ hợp ADN và hệ thống sinh học nhưng các nhà nghiên cứu vẫn rất khó phân biệt nó với nhiều mục tiêu và ý nghĩa của các kỹ thuật truyền thống do nó được đánh giá là có mức độ phức tạp hơn rất nhiều so với các kỹ thuật cải biến quá trình chuyển hóa (Porcar và Pereto 2012). Tuy nhiên, từ một đặc điểm sinh học nào đó có thể dùng các công cụ sinh học phân tử và các kỹ thuật để “điều chỉnh trước” (forward-engineer) hành vi của tế bào; để làm được điều này, cần phải phát triển được một loạt các phương pháp tiếp cận kỹ thuật chung và tiến hành thử nghiệm trong phòng thí nghiệm. Ý tưởng chính là theo đuổi phương pháp tiếp cận từ dưới lên (bottom-up approach) dựa vào các “bộ phận” phân tử sẽ được dùng để điều chỉnh trước hệ thống điều tiết (regulatory networks). Các mạch gen đầu tiên được tạo ra bằng các vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*), và được mô tả bằng các mô hình toán học đơn giản (phương pháp tiếp cận thiết kế dựa trên mô hình). Tuy nhiên, hành vi mong muốn chỉ đạt được sau khi các bộ phận được thay thế.

Porcar và Pereto (2012) đã đề xuất giới hạn sử dụng khái niệm “sinh học tổng hợp” trong bốn lĩnh vực nghiên cứu sau:

- Nghiên cứu lấy cảm hứng từ mô hình theo các nguyên tắc kỹ thuật nghiêm ngặt áp dụng cho công nghệ sinh học.
- Cách tiếp cận từ trên xuống làm đơn giản hóa đáng kể sự phức tạp tế bào và nhằm bổ sung các tế bào bán tổng hợp để dễ dàng thao tác hơn nữa.
- Các khảo sát thăm dò dựa trên kinh nghiệm theo cách tiếp cận từ dưới lên nhằm giải thích thêm một lần nữa sự gia tăng các tế bào proto phức tạp, biểu thị một liên kết giữa kiểu gen (thực thể thông tin) và phenotype (kiểu hình)/ hành vi nào đó.
- Các nghiên cứu về sinh học vũ trụ (Xenobiology)

Họ cũng đề xuất “các tiêu chuẩn loại trừ” như thiếu thiết kế, sử dụng các phân tích/ các chiến lược điều chỉnh bị lỗi, thiếu tính trực giao và/hoặc hệ mô đun, và đề xuất thêm nữa là các chiến lược đặc biệt và các phương pháp tiếp cận phi tiêu chuẩn không phù hợp với khái niệm.

Theo Stephanopoulos (2012), cần phân biệt sinh học tổng hợp xuất phát từ các phạm vi khác nhau để tránh sự lặp lại các lĩnh vực đang tồn tại dưới một các tên khác. Không có định nghĩa chính thức hoặc hình thức về “sinh học tổng hợp” hoặc “gen nhân tạo”. Định nghĩa về “sinh học tổng hợp” được trích dẫn thường xuyên trên trang <http://syntheticbiology.org/> như sau: Sinh học tổng hợp là: a) việc thiết kế và xây dựng các bộ phận, các thiết bị và các hệ thống sinh học mới, và b) việc thiết kế lại các hệ thống sinh học tự nhiên, đang tồn tại cho các mục đích hữu ích.

Nhiều bài báo cho rằng định nghĩa về "sinh học tổng hợp" tương đương với “gen tổng hợp”. König và các đồng nghiệp (2013) đã nỗ lực phân biệt sự khác nhau giữa “sinh học tổng hợp” và “gen nhân tạo”: Sinh học tổng hợp là việc thiết kế và xây dựng của các thành phần, chức năng và tổ chức sinh học (để thực hiện các chức năng mới). Gen nhân tạo bao gồm các công nghệ để tạo ra bộ gen tổng hợp hóa học có thể cho phép cùng một lúc thay đổi nhiều vật liệu di truyền của sinh vật.

Các thành phần chính dưới đây của sinh học tổng hợp (genomics) được xác định trong các định nghĩa:

- Các nguyên tắc kỹ thuật được áp dụng bao gồm cả kỹ thuật cải biến chuyển hóa (metabolic engineering) là dạng đơn giản nhất của sinh học tổng hợp cho đến các kỹ thuật can thiệp sinh học phức tạp (các mạng lưới kiểm soát, hệ thống, cơ quan sinh vật, hệ sinh thái). Trong phạm vi này, thuật ngữ “xây dựng” được dùng để mô tả sự tạo thành cả các bộ phận sinh học và các hệ thống sinh học.

- Sinh học tổng hợp được xác định rõ như là lĩnh vực liên ngành, đa ngành. Nó bao gồm việc sử dụng các công nghệ phân tử tiên tiến nhất (các phương pháp tiếp cận “omics”: **Omics** dùng để chỉ một lĩnh vực khoa học nghiên cứu trong sinh học có kết thúc bằng **-omics** như genomics, exomics, hoặc proteomics).

- Tính mới: các khái niệm, thiết kế, và việc sử dụng các phần tử giống các bộ phận, thiết bị và hệ thống sinh học phải rất mới lạ. Đồng thời phải tạo ra được các chức năng mới và độc đáo.

- Nền tảng cơ bản chứa đựng các phần tử tồn tại tự nhiên được thiết kế dựa theo các thiết kế sinh học để cải thiện chức năng của chúng. Bằng cách này, các hộp công cụ của các khối kiến tạo sinh học (“BioBricks™”) được tạo ra. Các hệ thống được thiết kế từ các mô đun đơn, mạnh mẽ và có thể dự đoán trước. Mục đích cuối cùng là không phụ thuộc vào các “khối kiến tạo” sinh học tiêu chuẩn.

- Các bộ gen cơ bản tối thiểu được tạo ra để thể hiện kết quả có hiệu quả và dự đoán được. Những bộ gen này chỉ chứa những bộ phận thiết yếu.
- Tự sao chép là một đặc điểm quan trọng của sinh vật sống tạo được.
- Các kiến thức về hành vi của các hệ thống sinh học là điều kiện tiên quyết cơ bản cho khái niệm này.

Từ đó, sinh học/bộ gen tổng hợp có thể được định nghĩa là: Việc thiết kế và xây dựng các cơ quan mới với khả năng tự sao chép, trên cơ sở các khái niệm các hệ gen tối thiểu và bằng cách sử dụng các khối kiến tạo sinh học đã được xác định rõ.

Lưu ý: Tháng 9/2014, “Quan điểm về định nghĩa Sinh học tổng hợp” đã được công bố nhằm giải quyết một nhiệm vụ về sinh học tổng hợp của Cơ quan Sức khỏe và Người tiêu dùng (SANCO), Nghiên cứu và Đổi mới (RTD), Doanh nghiệp và Môi trường cho 3 Ủy ban Khoa học về rủi ro môi trường và sức khỏe (SCHER), Ủy ban khoa học về Y tế và xác định rủi ro mới (SCENIHR), và Hiệp hội khoa học an toàn người tiêu dùng (SCCS).

Quan điểm này gồm cả định nghĩa định thao tác đối với sinh học tổng hợp (SCENIHR, 2014): *Sinh học tổng hợp (SynBio) là việc ứng dụng khoa học, công nghệ và kỹ thuật để dễ dàng và đầy nhanh việc thiết kế, sản xuất và/hoặc thay đổi các vật liệu gen trong các sinh vật sống.*

Sinh học tổng hợp và sinh học hệ thống

Sinh học tổng hợp là một lĩnh vực hoàn toàn khác biệt với sinh học hệ thống, kỹ thuật chuyên hóa và công nghệ sinh học. Mặt khác, sinh học tổng hợp, sinh học hệ thống và kỹ thuật chuyên hóa có sự kết hợp chặt chẽ. Các kỹ thuật và phương pháp luận được phát triển trong sinh học tổng hợp cũng rất quan trọng để thúc đẩy sự phát triển của sinh học hệ thống.

Sinh học hệ thống là một ngành khoa học mô hình hóa các quá trình (ví dụ như các mạng lưới điều tiết) và các thử nghiệm lặp đi lặp lại cùng với việc cải tiến các mô hình đó. Nó nổi lên từ sinh học phân tử, khi tiến bộ trong tự động lập trình tự ADN và các công cụ tính toán cải tiến đã cho phép các nhà khoa học kết hợp thí nghiệm và tính toán để giải mã (reverse-engineer) các mạng lưới tế bào (Cameron và cộng sự, 2014). Đây là một "phương pháp tiếp cận liên ngành nhằm cố gắng phát triển và thử nghiệm các mô hình toàn diện các hệ thống sống". Sinh học hệ thống đặt cơ sở cho kỹ thuật sửa chỉnh các sinh vật, tức là sinh học tổng hợp, bao gồm có hoặc không, phương pháp tiếp cận mới như là các thiết bị phản ứng nano, các nỗ lực để tái thiết kế các mạng lưới và các quá trình và gồm cả tổng hợp các nhiễm sắc thể hoàn chỉnh. Nó dựa trên cả phương pháp hệ thống “từ trên xuống” nhằm sử dụng mô hình định lượng để xác định và mô tả các mạng lưới điều tiết và tổng hợp sinh học cơ bản của một hệ thống, hoặc phương pháp tiếp cận

“từ dưới lên” để thử nghiệm các kiểu hình toàn hệ thống xuất hiện từ các tương tác giữa các thành phần.

Kỹ thuật chuyển hóa có thể được định nghĩa là sự tối ưu hóa hệ gen và các quá trình điều tiết bên trong các tế bào và các mô với mục đích gia tăng sản sinh các chất mong muốn và/hoặc giảm các chất không mong muốn; nó có thể dẫn đến nhiều quy trình hóa sinh hiệu quả năng lượng và giảm chi phí sản xuất quy mô lớn.

Kỹ thuật chuyển hóa xoay quanh việc thiết kế, kỹ thuật và tối ưu hóa các chuyển hóa để tạo ra một loạt các sản phẩm, bao gồm các loại nhiên liệu, vật liệu và hóa chất. Do việc tối đa hóa các sản phẩm của một chất chuyển hóa mong muốn nói chung liên quan đến việc đánh giá chất lượng và điều chỉnh chuyển hóa tế bào, các phương pháp tiếp cận sinh học tổng hợp có thể góp phần rất lớn để tạo ra các kết quả tốt nhất có thể. Tuy nhiên rất khó để vẽ ra ranh giới rõ ràng giữa hai lĩnh vực.

Giống như sinh học tổng hợp, kỹ thuật sửa đổi quá trình chuyển hóa tập chung chính vào cải thiện và/hoặc thiết kế các tế bào, theo các chiến lược khác nhau như tăng cường các dải chất nền, sản sinh ra các sản phẩm mới, tăng sản lượng và năng suất, và tăng sức khỏe tế bào. Trong hầu hết trường hợp, việc thiết kế và xây dựng các nhà máy tế bào cơ sở đòi hỏi kết hợp lĩnh vực sinh học và kỹ thuật tái tổ hợp ADN; do những tiến bộ trong sinh học hệ thống nên tương lai có thể không ngừng phát triển được các nhà máy tế bào có hiệu quả hơn.

Việc thiết kế các cơ quan để tạo ra các chất chuyển hóa quan trọng thường được nhắc đến là một trong những ứng dụng chủ yếu của sinh học tổng hợp. Mặc dù tái cấu trúc chất chuyển hóa là một thách thức do sự điều chỉnh phức tạp của các chuyển hóa, sinh học tổng hợp đã tiến bộ trong phạm vi tối ưu hóa các chất chuyển hóa trao đổi chất và kỹ thuật cải biến quá trình chuyển hóa. Các yếu tố cơ bản của kỹ thuật chuyển hóa trong phạm vi sinh học tổng hợp là thiết kế, xây dựng và tối ưu hóa con đường chuyển hóa mới. Tuy nhiên, trong khi việc tạo ra con đường chuyển hóa mới có thể tương đối dễ dàng thì việc phát triển nó để hỗ trợ quá trình thương mại lại có thể vô cùng phức tạp.

Điều quyết định sự thành công đối với kỹ thuật chuyển hóa tế bào là phải biết rõ các phản ứng chuyển hóa và các yếu tố điều tiết có ảnh hưởng đến số lượng vật liệu đưa vào quá trình chuyển hóa. Hai giai đoạn có thể xác định được đó là: giai đoạn chứng minh khái niệm - các liên kết enzym mới để tạo ra sản phẩm như mong muốn - và giai đoạn tối ưu hóa - điều chỉnh kiểm soát để cải thiện sản lượng sản phẩm. Các yếu tố cần thiết bao gồm các phương pháp kiểm soát con đường chuyển hóa tịnh tiến và phiên mã, kiểm soát đường không gian (ví dụ như giàn giáo, kỹ thuật phân tiểu tế bào, và tổng hợp (vi khuẩn)), mô hình hóa và đo lường mạng chuyển hóa. Chu trình thiết kế các kỹ thuật mới nổi bao gồm cả mô hình hóa và dự báo silic cũng như sự tiến hóa và sàng lọc có định

hướng. Nghiên cứu hóa chỉ tế bào (Metabolomics - bao gồm định hình chuyển hóa, phân tích dòng chuyển hóa, nhận dạng chuyển hóa) góp phần vào sự hiểu biết về các mạng lưới trao đổi chất, điều này sẽ giúp ích nhiều cho sinh học tổng hợp.

Porcar và Pereto (2012) gợi ý rằng việc đưa một con đường chuyển hóa phức tạp vào một vật chủ khác loài mà lại luôn luôn bị điều chỉnh và tối ưu hóa (“sự phức tạp của biến đổi di truyền”) tiếp cận đến “sinh học tổng hợp”. Các kỹ thuật chuyển hóa hệ thống đã được phát triển bắt nguồn từ các kỹ thuật cải biến con đường chuyển hóa. Thay vì xóa bỏ hoặc biểu hiện quá mức các gen nội sinh và đưa vào các gen dị thể, sự biểu hiện gen và các mạng lưới điều chỉnh phải thao tác được trong toàn bộ tế bào đó. Do đó, hiện nay kỹ thuật cải biến con đường chuyển hóa bao hàm các kiến thức vượt rất xa so với sự kiểm soát của con đường biểu hiện gen (Stephanopoulos 2012). Hơn nữa, nó còn bao gồm các phương pháp tiếp cận vượt xa kỹ thuật di truyền và sinh học phân tử phát triển bằng cách sử dụng các cấu trúc di truyền tổng hợp như các mạng lưới hoặc các mạch.

Trong khi kỹ thuật cải biến con đường chuyển hóa hiện nay tập trung chính vào việc thay đổi các con đường chuyển hóa đang tồn tại, kỹ thuật trong tương lai sẽ thiết kế các quá trình chuyển hóa và các cơ quan nhỏ mới (Bilgin và Wagner 2012).

Các ứng dụng kỹ thuật cải biến con đường chuyển hóa được mong chờ là sẽ có sự gia tăng đáng kể, cũng được thúc đẩy bởi các tác nhân thị trường, mối quan tâm về tính bền vững và mối quan tâm liên quan đến việc gia tăng sản xuất các sản phẩm từ các nguồn tái tạo (Stephanopoulos 2012).

Nhóm nghiên cứu Arpino (2013) và nhóm nghiên cứu Yadav (2012) kết luận rằng “thay vì trở thành ngành hiện đại, kỹ thuật cải biến con đường chuyển hóa vẫn là một tập hợp các luận chứng” - không quá ngạc nhiên, sinh học tổng hợp rất có tiềm năng hỗ trợ các phát triển trong lĩnh vực này một cách đáng kể trong tương lai. Sinh học tổng hợp mở ra các khả năng để tổng hợp và kiểm soát các con đường chuyển hóa phi tự nhiên, trong khi đó kỹ thuật cải biến con đường chuyển hóa cung cấp các phương pháp cơ bản để thiết kế phân tích và tối ưu hóa chúng.

Các con đường chuyển hóa tổng hợp

Động lực thúc đẩy để phát triển sinh học tổng hợp là ý tưởng hợp lý hóa các con đường chuyển hóa trong công nghệ sinh học công nghiệp, để cải tiến quy trình sản xuất các dược phẩm sinh học, các hóa chất tinh vi hoặc các nhiên liệu sinh học và phân hủy sinh học chất thải. Nghiên cứu nỗ lực áp dụng các nguyên tắc của sinh học tổng hợp vào việc cải thiện các con đường chuyển hóa được tóm gọn lại dưới từ khóa “kỹ thuật cải biến chuyển hoá”.

Công nghệ sinh học, tức là sự tổng hợp hoặc biến đổi năng lượng trong các tế bào vi khuẩn sống đã có hàng trăm năm tuổi, và việc sử dụng các dòng biến đổi di truyền đã trở

thành thói quen từ nhiều thập kỷ qua. Do đó rất khó để phân biệt giữa kỹ thuật di truyền cổ điển và sinh học tổng hợp trong bối cảnh này.

Các đánh giá khoa học hiện nay về kỹ thuật cải biến chuyển hoá thường đề cập đến mô đun hóa con đường chuyển hóa, điều chỉnh gen tự động multiplex, phân tích dòng chuyển hóa và kiểm soát động lực học bằng các thiết bị hiệu chỉnh. Các phương pháp tiếp cận này phần lớn được minh họa bằng thí dụ trong việc quá trình xây dựng con đường tổng hợp terpenoid khác loài.

Tổng hợp sinh học terpenoid hiện đang nhận được sự quan tâm đặc biệt, bởi vì các dược phẩm có nguồn gốc thực vật có tiềm năng như chất artemisinin chống sốt rét và hợp chất taxol chống ung thư có nguồn gốc từ các chất terpenoid. Terpenoids cũng là những khối kiến tạo cho các chất nhuộm carotenoi. Trong kỹ thuật cải biến con đường chuyển hóa, các gen tổng hợp sinh học terpenoid có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm men và các loại thực vật khác nhau được kết hợp lại với nhau để tối ưu hóa chi phí trong quá trình sản xuất *Escherichia coli*. Tuy nhiên, những nguyên tắc này cũng có thể được áp dụng cho bất kỳ con đường công nghệ sinh học nào khác. Kỹ thuật cải biến con đường chuyển hóa trong phạm vi hệ gen có thể được thực hiện bằng cách tổng hợp lâm sàng hoặc tổng hợp mới.

Sinh học tổng hợp hay vẫn là công nghệ sinh học thông thường?

Nhiều phương pháp nằm ở giao thoa giữa thực hành công nghệ sinh học thông thường với sinh học tổng hợp. Theo Nielsen và Keasling (2011), sự khác biệt có thể được mô tả như là một "nhà máy nền tảng tế bào" mà không phải là sản phẩm tự nhiên của bất kỳ hóa chất nào, và trong đó một con đường chuyển hóa tổng hợp (được thiết kế hoặc tổng hợp hợp lý) phải được chuyển giao (sinh học tổng hợp).

Montague và các cộng sự đã xác định và phân biệt các bộ gen nhân tạo từ kỹ thuật di truyền trên cơ sở "kỹ thuật và thao tác vật liệu gen của sinh vật theo tỷ lệ của bộ gen hoàn chỉnh hoặc số lượng các cặp base, hoặc số loci được thiết kế" là đặc trưng chính. Hơn nữa, ngay cả khi mục tiêu chính là thiết kế một con đường chuyển hóa tổng hợp sinh học riêng lẻ, "con đường này cần phải thực hiện tính năng hóa sinh và điều tiết với nhiều đầu vào và đầu ra.

Các thành phần chính cho việc xây dựng các con đường chuyển hóa phi tự nhiên là ADN tổng hợp, các chuyển mạch phân tử tiên tiến để kiểm soát trạng thái chuyển hóa, protein và các kỹ thuật chuyển hóa được tạo ra bởi sinh học tổng hợp. Bằng cách áp dụng các thành phần này hoạt động của enzym và tính đặc hiệu được cải thiện, các yếu tố đồng biến và các chất chuyển hóa được cân bằng, năng suất tăng lên và hiệu quả tổng hợp sản phẩm trực tiếp đạt được. Mặc dù một con đường có thể được mã hoá bởi chỉ một vài gen,

những thay đổi đối với bộ gen, ví dụ bằng cách tăng năng suất, làm nổi bật sự khác biệt giữa sinh học tổng hợp và kỹ thuật di truyền.

1.3. Những giới hạn đối với “kỹ thuật sửa bộ phận sinh học”

Sự hiểu biết về sinh vật học sẽ tiếp tục là yếu tố hạn chế trong bất kỳ các nỗ lực tái tạo hoặc mô phỏng toàn bộ hoặc một phần hệ thống sinh học. Hiểu biết về nội dung của các mạng lưới chuyển hóa và sự tương quan của nó với nồng độ chuyển hóa là một trong những thách thức rất lớn đối với các nghiên cứu về meta-omics (Boyle và Silver 2012). Nhưng sự phức tạp của các tế bào sống hiện nay vượt quá xa so với sự phức tạp của các thiết bị do con người tạo ra. Do còn thiếu các kiến thức nền nên chưa thể phát triển kỹ thuật tế bào hoàn chỉnh. Về lâu dài, chuyển hóa thực vật có thể được can thiệp dựa trên các chiến lược tổng hợp để tạo ra các hợp chất có đặc tính hóa học mới (Zurbriggen và cộng sự, 2012). Tuy nhiên, đến nay kỹ thuật của con đường chuyển hóa tổng hợp sinh học rất gian nan do sự phức tạp của nó và do hiểu biết hạn chế, đặc biệt về các gen thực vật. Các hệ thống sinh học tự lắp ráp mới ở mức độ phức tạp thấp và thường bao gồm ít hơn 10 chất hoạt hóa (Purnick and Weiss 2009) hoặc công suất hạn chế đối với lắp ráp các gen và kích cỡ lớn nhất của chúng (Xu và cộng sự, 2012). Hơn nữa, các công cụ sinh học tổng hợp quan trọng hiện nay mới chỉ được chứng minh hiệu quả trong phạm vi vi khuẩn *Escherichia coli* và *Saccharomyces cerevisiae*, do đó công cụ này mới chỉ giới hạn trong 2 loài sinh vật này. Hiện nay, phần lớn các dự án đang được tiến hành thực hiện trong phòng nuôi cấy vi khuẩn.

Kết quả của quy trình kỹ thuật nhằm mục tiêu tạo ra các hợp chất mong muốn phải có năng suất cao và độ chuẩn cao. Đây không phải là một nhiệm vụ dễ dàng, bởi vì việc đưa vào một con đường tổng hợp mới có thể khiến cho tiền chất chuyển hóa bị dẫn lưu đột ngột, dẫn đến sản sinh ra một số chất chuyển hóa, làm giảm hiệu suất và năng suất mong muốn đạt được.

Việc tạo ra các sản phẩm tự nhiên có nguồn gốc từ thực vật là một thách thức lớn do sự phức tạp của các thành phần cũng như sự phức tạp của các vật chủ sản sinh gốc tự nhiên của chúng. Sinh học tổng hợp cung cấp nhiều khả năng có thể vượt qua những trở ngại này bằng cách thiết kế các con đường sinh tổng hợp trong các vật chủ khác loài. Thách thức chính là nếu một con đường chuyển hóa biểu hiện sự thích nghi trong các vật chủ khác loài này (ví dụ con đường sinh tổng hợp thực vật trong các vi khuẩn) thì rất cần phải có thông tin trình tự di truyền, thiết kế chính xác của thông tin trình tự đối với hoạt động biểu hiện gen, tổng hợp sinh học và đo lường sản xuất cải tiến (Li and Pfeifer 2014). Những hạn chế này là do trên thực tế phần lớn các công cụ và kỹ thuật không thể hoán đổi được giữa các vật chủ và các chức năng của các bộ phận đó và các mô đun phụ thuộc vào tế bào. Lấy ví dụ như sự phong phú của các polymerase ARN và các ribosomes và thậm chí sự ức chế/ hoạt hóa chất chuyển hóa phụ thuộc vào tốc độ phát triển tế bào.

Do đó, hệ thống di truyền không hoạt động chính xác trên các chủng vi khuẩn mặc dù đã có các nỗ lực chuẩn hóa. Các nhà nghiên cứu về sinh vật học tổng hợp thường hay phải đối mặt với các hiện tượng sinh học phức tạp, chẳng hạn trao đổi chéo (cross-talk), chết tế bào, biểu sinh, đột biến, tiến hóa và nhiễu (Purnick and Weiss 2009). Nhìn chung, khả năng xây dựng các hệ thống di truyền từ các phần cơ bản của ADN của chúng ta bị hạn chế do vẫn còn thiếu hiểu biết về các cơ chế điều tiết trong tế bào (Yadav và cộng sự, 2012). Do đó, tế bào phải được thiết kế theo cách giảm thiểu đến mức có thể hoặc thậm chí khai thác những ảnh hưởng này.

II. SỰ SỐNG TỔNG HỢP

2.1. Tổng quan các con đường dẫn tới sự sống tổng hợp

2.1.1. Phương pháp từ trên xuống hoặc từ dưới lên

Các bộ phận sinh học tổng hợp trong cơ thể vật chủ đặc biệt cần được xác định ở hành vi lặp đi lặp lại (Kitney và Freemont 2012). Trong khi rất nhiều gen tham gia vào quá trình thông tin tế bào thì có những gen lại được chứng minh là không cần thiết đối với chức năng hoạt động của tế bào. Trước đây, người ta cho rằng có thể làm giảm sự phức tạp của bộ gen xuống mức “bộ gen tối thiểu” để có thể duy trì sự sống và sinh sản của tế bào (trong điều kiện hỗ trợ bên ngoài). Ý tưởng này được khai thác dựa trên một phương pháp có tên gọi là phương pháp từ trên xuống. Phương pháp từ dưới lên bắt đầu bằng việc xây dựng một tế bào tổng hợp từ mảnh rời (scratch): một thực thể giống sự sống được tạo ra bằng cách lắp ráp các thành phần phân tử. Chúng có thể có bản chất sinh học hoặc hoàn toàn là các thành phần hóa học đặc biệt. Giữa hai phương pháp này là khái niệm về sinh học phi tự nhiên (xenobiology), nhằm mục đích xây dựng các axit nucleic chức năng thay thế (Porcar và Pereto 2012).

Mục đích của phương pháp từ trên xuống là nhằm đơn giản hóa các tế bào đã rút gọn để hình thành một vật chủ để gắn các thiết bị sinh học tổng hợp. Phương pháp này đã được thử nghiệm trên các loài vi khuẩn và nấm men. Các gen không thiết yếu - thường chịu trách nhiệm thích nghi với stress hoặc sự thay đổi của các điều kiện môi trường - sẽ bị loại bỏ, như là các vùng intergenic.

Đối với phương pháp từ dưới lên, toàn bộ chuỗi trình tự tối thiểu được thiết lập từ mảnh rời, tổng hợp và biến đổi thành một vỏ bọc tế bào phù hợp. Sau nghiên cứu đầu tiên được thực hiện vào năm 2007, phương pháp này đã được áp dụng thành công trên loài vi khuẩn *Mycoplasma genitalium* và *Mycoplasma mycoides/ Mycoplasma capricolum*.

Ba kết quả nghiên cứu chính được xác định gồm có: tổng hợp quy mô lớn các bộ gen của vi khuẩn, tái thiết kế các con đường chuyển hóa (sản xuất các hợp chất mong muốn),

và thiết kế hợp lý các thiết bị logic di truyền từ các mô đun ADN (Agapakis và cộng sự. 2012).

2.1.2. Điều kiện tiên quyết

Kỹ thuật lắp ráp bộ gen tổng hợp

Công nghệ tổng hợp ADN cho phép tạo ra toàn bộ hệ gen. Trong sinh học tổng hợp, ADN tùy chỉnh được sử dụng để xây dựng các phân đoạn ADN lớn hơn, nhóm các đoạn này được ghép với nhau thành các đoạn lớn hơn được lắp ghép cho đến khi thu được sản phẩm ADN mong muốn (Montague và cộng sự. 2012). Hai phương pháp được sử dụng phổ biến nhất là BioBricks™ (hoặc lắp ráp tiêu chuẩn) và Gibson Assembly®, được bổ sung bởi các hệ thống khác như GoldenBraid, trong đó, tận dụng các đoạn GB (các đoạn ADN có bốn đoạn nucleotide chưa được ghép nối), làm các khối lắp ghép tối thiểu. GoldenBraid đã được chứng minh là một hệ thống lắp ghép mô-đun trong sinh học tổng hợp thực vật. Có nhiều phương pháp khác nhau, phụ thuộc vào kích thước, bao gồm cả những phương pháp BglBricks, CPEC (Circular Polymerase Extension Cloning – nhân bản kéo dài polymerase vòng), Golden Gate, và đối với phương pháp chồng chéo không phụ thuộc trình tự lắp ghép lớn hơn như SLIC (Phương pháp tạo dòng không phụ thuộc trình tự và enzym nối), InFusion, Clontech™, Gibson Assembly®, SLiCE (Seamless Ligation Cloning Extract) và CPEC USER (nhân bản loại bỏ thuốc thử cụ thể Uracil). Đặc biệt, hiện nay, TAR (Phương pháp tái tổ hợp Liên kết - Chuyển đổi ở loài *Saccharomyces cerevisiae*) và Gibson Assembly® đã chứng minh thành công. Ngược lại với việc xây dựng bộ gen mới bằng phương pháp tổng hợp và lắp ráp ADN, các phương pháp tái tổ hợp phân tán như MAGE/CAGE và TRMR trên loài vi khuẩn *Escherichia coli* hoặc Green Monster đối với loài *Saccharomyces cerevisiae* hiện đang được sử dụng. Cho đến nay, những phương pháp này chỉ giới hạn sử dụng trong một tập hợp hẹp các sinh vật, vì vậy nhiều công cụ chuyển hóa và sinh học vẫn chưa có cơ hội được sử dụng (Montague và cộng sự. 2012).

Chuẩn hoá

Quá trình chuẩn hóa rất cần thiết để sao chép chính xác các thiết bị và hệ thống sinh học tổng hợp. Tuy nhiên, hiện tại, mô tả đặc điểm đầy đủ của các bộ phận vốn rất quan trọng nhưng lại chưa đạt đến mức độ phù hợp. Các bộ phận cần phải được mô tả trong một ngữ cảnh cụ thể về di truyền hoặc môi trường và không hoạt động theo cách thức có thể dự đoán khi ra khỏi ngữ cảnh này. Do đó, việc cần làm là giải quyết các vấn đề mô tả đặc trưng các bộ phận và khả năng tương tác bằng cách tăng phạm vi và sự đa dạng của các thiết kế thử nghiệm (Cameron và cộng sự. 2014).

Đăng ký các bộ phận

Để tận dụng hiệu quả các bộ phận, cần xác định việc đăng ký các bộ phận một cách chuyên nghiệp. Việc đăng ký bao gồm một cơ sở dữ liệu có mô tả đặc trưng đầy đủ của các bộ phận trong bối cảnh vật chủ phù hợp. Để giải quyết công tác lưu trữ và lắp ghép các bộ phận di truyền, cơ sở dữ liệu mở "Đăng ký các bộ phận sinh học tiêu chuẩn" (Registry of Standard Biological Parts (RSBP)) được thiết lập, tạo điều kiện cho việc lắp ráp các bộ phận thành các mạch lớn hơn bằng cách lưu giữ chúng theo định dạng "BioBrick™" đã được chuẩn hóa. Các nhà khoa học đã xây dựng và phát triển một ngôn ngữ tính toán chuẩn (Ngôn ngữ mở sinh học tổng hợp, SBOL) để mô tả các bộ phận và thiết kế, cũng như để hỗ trợ quá trình trao đổi.

Vật chủ và bộ gen tối thiểu

Nội dung cốt lõi trong sinh học tổng hợp là khái niệm "Bộ gen tối thiểu", nghĩa là bộ gen tối thiểu cần thiết để cho phép tế bào sống, trên đó có thể bổ sung thêm các gen và sau đó cấy ghép vào cơ thể vật chủ. Bộ gen tối thiểu bao gồm những thành phần đơn giản nhất có thể để duy trì sinh sản, sinh tồn và tiến hóa. Để phát triển một lõi hay vật chủ tối thiểu, bộ gen sẽ được tối giản thành một tập hợp những gen hữu dụng về mặt chức năng. Kết quả sẽ hình thành một vật chủ có cấu trúc đơn giản, có thể dự đoán được và có khả năng lập trình để có thể sinh sản một cách an toàn và kiểm soát được, bao gồm các cơ chế ngăn ngừa nó thoát ra môi trường ngoài ý muốn và đảm bảo cách ly với các sinh vật khác. Bộ gen tối thiểu cho phép tránh những rủi ro tiềm tàng, ví dụ bằng cách làm giảm thiểu khả năng tế bào sinh sôi trong điều kiện môi trường tự nhiên và không gây bệnh. Mục đích là để tạo ra các hệ thống tế bào đơn giản, có thể được sử dụng để giải đáp các câu hỏi khoa học liên quan đến sự tương tác có tính hệ thống của các mô-đun tế bào.

Vật chủ được tạo thành từ một nhà máy tế bào an toàn và thông dụng, bao gồm quá trình tái tạo lộ trình tổng hợp hoàn toàn và sự biến đổi của các dòng chuyển hóa. Trong sản xuất công nghiệp, một số nhà máy tế bào nấm và vi khuẩn đã được sử dụng như: chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* để sản xuất nhiên liệu, chủng vi khuẩn *Escherichia coli* để sản xuất dược phẩm hoặc *Corynebacterium glutamicum* để sản xuất axit amin. Điển hình, *Escherichia coli* được xem là một loài sinh vật mô hình thử nghiệm lý tưởng trong nghiên cứu sinh học tổng hợp do hiểu biết cơ học về đặc điểm sinh học ở loài này đã được các nhà khoa học nghiên cứu kỹ càng, thao tác di truyền dễ thực hiện và một số lượng tương đối lớn các hệ thống điều chỉnh gen cũng được nghiên cứu kỹ lưỡng.

2.1.3. Nhà máy tế bào nền tảng

Sinh học tổng hợp và kỹ thuật chuyển hóa tương tác để biến các tế bào sống thành các nhà máy vi sinh được sử dụng trong sinh học công nghiệp ("bộ máy tự tái sinh"). Mục đích là nhằm thu thập một số ít các nhà máy tế bào nền tảng có sẵn để sản xuất các loại nhiên liệu và hóa chất. Lợi thế chính của nền tảng này là nó có thể được sử dụng để

chèn nhiều con đường chuyển hóa tổng hợp khác nhau. Ví dụ, một nhà máy tế bào nên tăng được tạo ra để có thể tạo ra tiền chất chuyển hóa quan trọng cho nhiều sản phẩm, chẳng hạn Acetyl Co-A để sản xuất polyketides, lipid và isoprenoids (nước hoa, dầu sinh học, thuốc chống sốt rét, kháng sinh, cao su, thực phẩm chức năng, thành phần thực phẩm và vitamin).

2.1.4. Sinh học tổng hợp không tế bào

Một lĩnh vực thay thế đang nổi là *sinh học không tế bào*, được định nghĩa là "sự kích hoạt các quá trình sinh học phức tạp mà không sử dụng tế bào sống còn nguyên vẹn" (Harris và Jewett 2012). Nó có khả năng tập trung vào sản xuất một hợp chất duy nhất mà không có rào cản vật lý, tạo điều kiện cho việc bổ sung chất nền, loại bỏ sản phẩm và lấy mẫu nhanh chóng, giúp tiếp xúc trực tiếp với các điều kiện phản ứng và sử dụng toàn bộ lượng phản ứng. Một ưu điểm nữa là không có xung đột giữa tăng trưởng vi sinh vật và các mục tiêu thiết kế kỹ thuật. Ví dụ nổi bật nhất là tổng hợp protein không chứa tế bào (CFPS), cho phép tổng hợp các protein có chứa các axit amin không tự nhiên. Các ưu điểm hướng ứng dụng chính của các hệ thống không có tế bào là sự biểu hiện gen của nhiều sản phẩm có thể được điều chỉnh để tạo thuận lợi cho quá trình tương tác sản phẩm thích hợp, phản ứng và sự ổn định của sản phẩm có thể được tối ưu hoá bằng cách điều chỉnh mật độ mẫu ADN và kiểm soát khả năng oxy hóa redox để tạo thành disulphide tối ưu, khả năng tái tổ hợp các protein độc hại, sản xuất các chất xúc tác sinh học phức tạp (Smith và cộng sự. 2014). Chúng vượt qua những hạn chế cố hữu của tế bào sống, cho phép kiểm soát biểu hiện gen, tối ưu hóa vật chủ, giám sát tại chỗ và tự động hóa. Các hệ thống không có tế bào được sử dụng để phát triển các con đường phản ứng mới làm tăng đáng kể năng suất lên thành các hệ thống vi mô. Nó cho phép phát triển nhanh hơn và có thể dự đoán được các mạch gen mô-đun, như kiểm soát môi trường và các thành phần phản ứng, và tiếp cận với phản ứng được tạo điều kiện thuận lợi - ứng dụng là kỹ thuật các tế bào nhân tạo tối giản và các vi thiết bị giống tế bào.

2.2. Xây dựng tế bào mới

Thiết kế và tổng hợp

Các phân đoạn ADN được thiết kế tổng hợp để mã hóa các chức năng mới cần được tạo thành một cơ thể thích hợp bằng một trong những kỹ thuật chỉnh sửa gen phổ biến hoặc bằng các phương pháp nhân dòng cỡ lớn mới. Mục đích là nhằm giảm mức độ phức tạp. Một lựa chọn là nhằm biến đổi bộ gen của vật chủ theo trình tự mới, giúp loại bỏ được nhiều khả năng xảy ra các can thiệp vào gen di truyền. Do có nhiều gen tham gia vào quá trình thông tin giữa các tế bào (tế bào-tế bào) trong khi các gen khác không cần thiết đối với hoạt động chức năng của tế bào, trước đây người ta cho rằng có thể giảm độ phức tạp của bộ gen xuống mức một bộ gen tối thiểu để duy trì sự sống và sinh sản của tế

bào (Sole và cộng sự. 2007). Cho dù kích thước có nhỏ đến cỡ nào thì bộ gen tế bào vẫn phải chứa đựng đầy đủ tất cả thông tin cần thiết để nó có thể thực hiện các chức năng thiết yếu nhằm duy trì sự cân bằng nội môi (tự duy trì sự sống), sinh sản (tự sinh sản) và tiến hóa (khả năng tiến hóa) - ba đặc tính của tế bào sống.

Điều quan trọng là thiết bị hoặc hệ thống tổng hợp vừa tách ra khỏi quá trình chuyên hóa nhờ khả năng phát triển và tồn tại độc lập của tế bào vừa không ảnh hưởng đến các quá trình này.

"Phương pháp tổng hợp vi khuẩn của bất kỳ sản phẩm tự nhiên thực vật có thể được thực hiện bằng cách "tổng hợp sản phẩm tiền thân trung gian", trong đó con đường chuyển hóa của vật chủ hiện tại được biến đổi để phù hợp với con đường chuyển hóa dị hợp hoặc bằng phương pháp "tổng hợp mới", trong đó con đường sinh tổng hợp mới so với vật chủ được tiếp nhận. Nhiều phương pháp tổng thể đã được áp dụng nhằm cải thiện quá trình tổng hợp terpenoid trong loài vi khuẩn chủ" (Moses và cộng sự. 2013).

2.2.1. Bộ gen tối thiểu – phương pháp từ trên xuống

Theo lý thuyết, sự tăng trưởng trong điều kiện một môi trường xác định và giàu chất dinh dưỡng tổng hợp chỉ cần 206 gen, cơ bản bao gồm sao chép ADN, bộ máy phiên mã và dịch mã, các chức năng sửa chữa ADN thô sơ, xử lý và phân hủy protein, phân chia tế bào và các chức năng năng lượng và chuyển hóa thô sơ (Heinemann và Panke 2006). Kích cỡ bộ gen nhỏ nhất đã được phát hiện trong các tế bào prokaryote sống cộng sinh với các sinh vật khác.

Các ví dụ đáng chú ý là loài ký sinh trùng ở người, cổ khuẩn *Nanoarchaeum equitans*, rệp rừng - *Buchnera aphidicola* BCC, *Candidatus Carsonella ruddii* và *Candidatus Sulia muelleri*. Tất cả các vi sinh vật này đều là các vi khuẩn phụ thuộc vào thân chủ dị dưỡng. Chúng phụ thuộc vào môi trường phức tạp về hóa học được biểu hiện bởi các tế bào chủ của chúng. Khi thích ứng với lối sống cộng sinh, bộ gen của chúng trải qua một quy trình tối giản, trong đó các gen dư thừa, không cần thiết trong môi trường mới được kiểm soát bởi vì các chức năng được vận hành bởi vật chủ có xu hướng bị mất đi (Moya và cộng sự. 2009).

Gen thiết yếu

Bước đầu tiên để tạo ra một tế bào tối thiểu là phải giải đáp câu hỏi có bao nhiêu gen cần thiết để hỗ trợ sự sống tế bào. Mức độ thiết yếu của gen phụ thuộc vào điều kiện môi trường. Esvelt và Wang (2013) xác định được một tập hợp các đặc tính hữu ích cho một vật chủ sinh học như sau:

- Tăng trưởng nhanh trong môi trường tối thiểu với glucose
- Có khả năng lên men
- Có khả năng thực hiện trao đổi di truyền

- Dù nhỏ đến mức việc loại bỏ thêm bất kỳ gen nào đều ảnh hưởng tiêu cực đến ba đặc điểm nêu trên.

Một cách thức tiếp cận thành phần gen của một bộ gen tối thiểu là bằng các *bộ gen so sánh*. Giả thuyết cơ bản được đặt ra là các gen chung giữa các loài có họ xa với nhau thường có vai trò thiết yếu. Đặc điểm hạn chế của phương pháp này là: một số chức năng thiết yếu của tế bào có thể được thực hiện bởi một số protein thay thế và không liên quan, và sẽ bị lạc hướng bởi các phương pháp so sánh. Bộ lõi tối giản so sánh (tập hợp các gen chung) chỉ tìm kiếm những gen chức năng về bản chất là không thể thay thế. Nhiệm vụ xác định lõi loại trừ tối thiểu không hề đơn giản vì những vấn đề quan trọng sau:

1. *Phần gen chưa được ghép cặp khá rõ ràng*: Sự bất hoạt của các gen đơn lẻ không giúp phát hiện các chức năng thiết yếu được mã hoá bởi các gen chưa được ghép cặp, và không thể bỏ qua cùng một lúc một số gen không cần thiết, hiện tượng này gọi là sát lực tổng hợp (Moya và cộng sự. 2009).

2. *Cơ chế phân chia tế bào vẫn chưa hoàn toàn được hiểu rõ*: Lý thuyết về khả năng tự tái sinh (máy sao chép/dịch mã, máy nhân bản và điều chỉnh) được áp dụng hiệu quả đối với các chương trình tự động, nhưng không đảm bảo được rằng nó cũng sẽ hoạt động trong tế bào nhân tạo (Noireaux và cộng sự. 2011). Sự sống không chỉ là một chương trình, nó cũng phụ thuộc vào các đặc tính không di truyền cơ bản khác như: tự tổ chức và tập hợp phân tử.

3. *Mỗi phần của bộ gen liên kết lỏng lẻo với phần còn lại*: khi thiết kế các cấu trúc hoặc tế bào mới, cần lưu ý rằng còn có các câu hỏi cơ bản về các quá trình không di truyền không được xác định trong chương trình ADN. Sinh vật sống là một hệ thống mở được tạo thành từ hàng trăm phản ứng hóa học có đặc tính vượt quá chương trình ADN. Việc lắp ghép một tế bào tổng hợp mở ra tầm quan trọng của các lĩnh vực vật lý, trong cơ thể, được điều chỉnh bởi các hệ thống gen đã phát triển (Noireaux và cộng sự. 2011).

Một cách khác là thực hiện các nghiên cứu *bất hoạt quy mô lớn* để xác định gen cần thiết cho sự sống còn của tế bào trong một số mô hình vi khuẩn có đặc điểm sinh học rõ ràng (vi khuẩn *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*,...), sự bất hoạt hệ thống của từng gen riêng lẻ có trong một bộ gen. Tuy nhiên, tất cả các phương pháp này đều có những điểm hạn chế bởi vì các nhà khoa học đã phát hiện thấy một số khả năng phân loại sai của gen (Moya và cộng sự. 2009).

Việc đơn giản hoá các tế bào hiện đại đã được tiếp cận theo cách thứ ba, bằng cách tìm kiếm *mô tả sinh hóa của con đường chuyển hóa* được xác định rõ ràng cần thiết để thực hiện các chức năng thiết yếu. Forster và Church (2006) đã mô tả bộ gen tối thiểu có chứa gen cần thiết cho quá trình thông tin nhưng không bao gồm các gen chuyển hóa trung gian (chuyển hóa lipid và glycolysis), đại diện cho thành phần chính cần thiết để

tổng hợp hệ thống tự sao chép tối thiểu. Các túi tự tái tạo được xác định trong bộ gen tối thiểu cho phép vận chuyển phân tử nhỏ qua màng. Hệ thống này hoàn toàn bao gồm các gen với các chức năng được xác định rõ ràng, được thiết kế mô-đun và cho phép gỡ lỗi hệ thống theo từng hệ thống để tự sao chép. Moya và cộng sự (2009) đề xuất rằng phương pháp này có thể là một khởi đầu tốt đẹp để tổng hợp một hệ thống tự sao chép hữu ích, gần như tối thiểu, phụ thuộc vào các chất nền tăng cường bổ sung.

Các vi khuẩn có bộ gen kích thước nhỏ:

- *Mycoplasma genitalium*: Bộ gen có kích thước 580kb được xem là nhỏ nhất trong số các sinh vật tăng trưởng trong môi trường nuôi cấy thuần túy, tuy nhiên nó lại mang tất cả các gen thiết yếu cho các quá trình thông tin (sao chép, dịch mã, cuộn gấp và xử lý protein) cộng với chuyển hóa ở mức độ hạn chế. Nó vẫn đại diện cho bộ gen nhỏ nhất được biết đến của một loài vi khuẩn được nuôi cấy trong phòng thí nghiệm và do đó gần như là một bộ gen độc lập tối thiểu.

- *Nanoarchaeum equitans*: là loại cổ khuẩn duy nhất được biết đến với dạng sống cộng sinh. Kích thước bộ gen của nó là 490 kb với một hệ thống xử lý thông tin hoàn chỉnh và một bộ máy chuyển hóa được đơn giản hóa cao.

- *Gammaproteobacteria*, *Buchnera aphidicola* BCc và *Candidatus Carsonella ruddii* là ba vi khuẩn của côn trùng có bộ gen vi khuẩn rất nhỏ. Vai trò của chúng trong quá trình cộng sinh tương ứng là cung cấp các chất dinh dưỡng thiếu trong chế độ ăn uống của côn trùng, chủ yếu là các axit amin và vitamin cần thiết.

- Bộ gen nhỏ nhất với kích thước 1,308 Mb của một tế bào được sao chép độc lập một cách tự nhiên thuộc về loài vi khuẩn biển dị dưỡng quang *Pelagibacter ubique*.

2.2.2. Xây dựng tế bào mới – phương pháp từ dưới lên

Tế bào tổng hợp

Trái với phương pháp từ trên xuống, phương pháp từ dưới lên bắt đầu từ mảnh rời: một thực thể được hình thành bằng phương pháp tự lắp ghép các thành phần phân tử (Sole và cộng sự. 2007). Những thành phần này có thể có bản chất sinh học hoặc hoàn toàn là các thành phần hóa học đặc biệt. Một phương pháp khác là tổng hợp một tế bào từ các yếu tố cơ bản của nó. Trong phương pháp này, nhận thức toàn diện về ba thành phần thiết yếu của đời sống tế bào - thông tin ADN, phân chia và chuyển hóa – là các điều kiện tiên quyết.

Tế bào tổng hợp, được tạo nên từ mảnh rời, là một khoang đặc biệt có cấu trúc và tổ chức tương tự như vi khuẩn. ATP và GTP được sử dụng làm nguồn năng lượng trong các giai đoạn đầu của quá trình phát triển. Đối với phần thông tin, các chương trình ADN tổng hợp sẽ được thể hiện bằng các bộ máy sao chép và dịch mã trích xuất từ sinh vật.

Ranh giới vật lý của tế bào nhân tạo là 2 lớp phospholipid. Mô hình 2 lớp lipid cũng là mẫu tự nhiên cho các protein màng.

Vách tế bào, bám chặt vào màng lipid, cung cấp sức bền kết cấu cho vi khuẩn. Việc tạo một khoang ổn định với một giao diện hoạt động là một trong những bước khó khăn nhất trong quá trình tổng hợp tế bào nhân tạo được lập trình bằng ADN. Việc chèn hiệu quả các protein màng vào mô hình 2 lớp là hạn chế hiện tại thực sự cho sự phát triển của một giao diện hoạt động. Các protein màng có thể được thể hiện và tích hợp vào mô hình 2 lớp phospholipid (Noireaux và cộng sự. 2011).

Mỗi sinh vật sống là một hệ thống mở được tạo thành từ hàng trăm phản ứng hóa học có đặc tính vượt quá chương trình ADN. Quá trình liên tục hấp thu năng lượng và loại bỏ các phản ứng phụ là rất quan trọng đối với mọi hệ thống sống cũng như tế bào tổng hợp. Việc xây dựng một tế bào nhân tạo đòi hỏi sự phát triển của một môi trường nhân tạo. Môi trường bên ngoài phải là một dung dịch tiếp liệu không phân giải đẳng trương duy trì trạng thái sinh lý bằng cách trao đổi các chất dinh dưỡng khối lượng phân tử thấp, nucleotide và các axit amin thông qua màng phospholipid (Noireaux và cộng sự. 2011). Sự trao đổi có chọn lọc, các vấn đề về áp suất thẩm thấu, và phiên mã/dịch mã hiệu quả là một trong những vấn đề phải được giải quyết để có thể thu được một túi vi phẫu khả thi ban đầu.

Vật chủ

Cho đến nay, vật chủ được sử dụng thông dụng nhất là khuẩn *Escherichia coli* (*E.coli*). Tuy nhiên, bên cạnh đó còn có các loài vật chủ được liệt kê sau đây:

- Escherichia coli:

1. Là một ví dụ nổi bật với bộ gen đã được giảm đến 15% trong nhiều nghiên cứu mà không gây tác động đáng chú ý nào đối với các tính chất sinh lý.

2. Ưu điểm là có sẵn nhiều thể truyền (vector) như: plasmid, cosmids, BACs và các promoter (vùng gen khởi động) để biểu thị dị loại, và biểu thị các gen có sử dụng codon G + C lên đến 73%, nhưng không nhận dạng promoter từ *Streptomyces*.

3. *E. coli* là một trong những vật chủ phổ biến nhất được sử dụng trong sinh học tổng hợp bởi vì chúng có thể được nuôi cấy dễ dàng và có hệ di truyền tương đối đơn giản, dễ dàng thao tác. Hơn nữa, có thể tạo ra các chủng phòng bệnh không gây nhiễm từ loài này.

4. Cho đến nay, *E. coli* là dạng sự sống tế bào được nhận thức đầy đủ nhất; bộ gen của nó có hơn 4 triệu cặp base ADN và khoảng 5.000 gen được mã hóa (Glass 2012).

- Các loài Mycoplasma:

Mycoplasma genitalium chỉ có 525 gen, bằng khoảng 1/10 số lượng gen được mã hóa bởi *E. coli*. So với *Mycoplasma capricolum*, tốc độ tăng trưởng của nó chậm hơn rất

nhiều. *Mycoplasma capricolum* đã được sử dụng làm vật chủ trong cấy ghép trình tự bộ gen số hóa của *Mycoplasma mycoides* (Gibson và cộng sự. 2010).

-*Bacillus subtilis*:

Bacillus subtilis có thể được thao tác một cách dễ dàng liên quan đến những thay đổi di truyền. Đôi khi nó được sử dụng thay cho E. coli nhờ có một số tính chất thích hợp hơn với các hình thức di truyền học cụ thể liên quan đến sinh học tổng hợp, ví dụ các mạch ADN có thể dễ dàng tích hợp vào bộ gen *Bacillus subtilis*.

Kỹ thuật bộ gen tối thiểu tạo điều kiện thuận lợi đáng kể cho khả năng tối ưu hóa *Bacillus subtilis* thành một loài vật chủ sinh sản. Các loài *Bacillus* chủ yếu được sử dụng trong sản xuất các enzym quan trọng (như alpha-amylase) và các chất sinh học (như chất hoạt động bề mặt sinh học) được sử dụng trong công nghiệp.

Một số loài *Bacillus* đã trở thành nền tảng quan trọng cho việc sản xuất các enzym và hóa chất khác nhau. Có thể thu được một loạt các kiểu hình tế bào ở loài *Bacillus* bằng cách điều chỉnh và thay đổi con đường chuyển hóa tương ứng ở cấp độ toàn bộ và gen cụ thể. Dữ liệu trình tự bộ gen của loài *Bacillus* có thể thấy trong các cơ sở dữ liệu có sẵn.

“Vi khuẩn có chức năng tương đương chức năng của một hệ thống miễn dịch phát triển để bảo vệ chúng khỏi các thực thể và các vi rút tấn công vi khuẩn. Hệ miễn dịch của vi khuẩn là một phức hợp các enzym được gọi là hệ thống điều chỉnh - giới hạn cho phép vi khuẩn nhận diện và phá hủy ADN ngoại lai, thường xuất phát từ một thể thực khuẩn gây nhiễm. Một trong các enzym đó là methylase – thay đổi về mặt hóa học base ADN ở các trình tự cụ thể. Một enzym giới hạn khác cũng nhận dạng ADN của vi khuẩn, và do đó nó tự phân biệt được với ADN ngoại lai có thể xâm nhập vào tế bào trong quá trình gây nhiễm thể thực khuẩn (Glass 2012).

- Nấm men

Loài nấm men chủ yếu được sử dụng làm vật chủ trong sinh học tổng hợp là *Saccharomyces cerevisiae*. Nó được sử dụng rộng rãi trong sinh học phân tử, đặc biệt là trong nghiên cứu tế bào nhân điển hình, liên quan chặt chẽ tới lĩnh vực sinh học ở người. Loài sinh vật nhân chuẩn này dường như có khả năng chứa chuỗi phân tử ADN biến đổi lớn hơn đáng kể so với chủng E. coli. Vi sinh vật nhân điển hình có khả năng kết hợp các đoạn ADN đồng nhất, cho phép hình thành 200 cặp base gồm các mảnh ghép tổng hợp.

Kỹ thuật tổng hợp tế bào

Phương pháp này tập trung vào quá trình tổng hợp các bộ gen tối thiểu nhưng hoàn chỉnh cũng như quá trình chèn chúng vào các tế bào để tái thiết kế và kiểm soát quá trình chuyển hóa (Moya và cộng sự. 2009).

Dựa trên hình thức sửa đổi và cấp độ di truyền của sửa đổi, Ellis và cộng sự (2011) đã phân loại ba vấn đề sau đây:

1. Các bộ phận của gen
2. Các gen tham gia vào con đường chuyển hóa
3. Các con đường chuyển hóa đến bộ gen

Các bước này bao gồm kết hợp các bộ phận để tạo ra các gen, liên kết các gen để tạo ra các con đường chuyển hóa và thiết bị (devices), từ đó sắp xếp chúng lại với nhau để tạo ra các nhiễm sắc thể và bộ gen tổng hợp.

Quá trình lắp ghép chuỗi phân tử ADN là một yếu tố hạn chế đối với hầu hết các phòng thí nghiệm. Các phương pháp khác nhau về cơ chế và quy mô, cho phép khả năng tự ghép nối nhiều bộ phận trong một phản ứng (lắp ghép song song), tạo ra sự sắp xếp vật lý được xác định trước (lắp ghép theo thứ tự) hoặc cho phép nhiều phiên bản của các bộ phận được sử dụng đồng thời (lắp ghép tổ hợp). Thách thức được đặt ra đối với lĩnh vực sinh học tổng hợp là cần phát triển các phương pháp lắp ghép được chuẩn hóa, cho phép thực hiện ở tất cả các cấp độ rút gọn - gen, con đường chuyển hóa và bộ gen, đồng thời, cần nhận thức rõ ràng về tính phụ thuộc bối cảnh khi các bộ phận được đặt bên cạnh các bộ phận khác.

Về mặt chức năng, quá trình lắp ghép một gen từ các bộ phận riêng biệt của nó đòi hỏi phải được thực hiện theo một trình tự nhất định. Các chuỗi se - các bazơ không có chức năng bị một số phương pháp lắp ráp bỏ lại - là điều không mong muốn vì chúng thường xuyên ảnh hưởng đến cách thức các bộ phận hoạt động cùng nhau và các bộ phận riêng lẻ đã được lắp ráp không thể thay thế bằng phương pháp khác.

Phương pháp lắp ráp lý tưởng hóa phải phù hợp với việc xây dựng tổ hợp từ các thư viện bộ phận tiêu chuẩn không yêu cầu vị trí cắm và cho phép sắp xếp theo một trật tự được xác định trước trong sản phẩm cuối cùng. Phương pháp lắp ráp có thể được thực hiện nhanh chóng trong một phản ứng song song, ở quy mô bất kỳ và chỉ để lại se giữa các bộ phận có thể chịu được. Hiện nay chưa có bất kỳ phương pháp nào có thể đáp ứng được tất cả các yêu cầu trên, do đó phương án thích hợp nhất là sử dụng một số kỹ thuật song song (Ellis và cộng sự. 2011).

Tổng hợp bộ gen

Tổng hợp bộ gen, tức là tổng hợp ADN của toàn bộ hệ gen, đòi hỏi thực hiện tổng hợp hóa học các phân tử ADN từ bốn nucleotide ADN khác nhau hoặc các bazơ: Adenine, Guanine, Thymin và Cytidine. Bốn bazơ này được tổng hợp về mặt hóa học từ glucose và được lắp ghép tuyến tính trong các trình tự cụ thể sử dụng một dụng cụ được gọi là bộ tổng hợp oligonucleotide (Glass 2012).

Ghép gen

Là quá trình cài đặt một nhiễm sắc thể vi khuẩn trần vào một tế bào nhận phù hợp theo cách thức mà bộ gen đã được cài đặt theo thứ tự và tái lập trình bộ máy của tế bào nhận. Kết quả là tế bào chỉ có các thuộc tính được mã hoá bởi bộ gen mới (Glass 2012).

Các bộ phận của gen

Các kỹ thuật hiện tại sử dụng các giao thức lắp ghép enzym giới hạn được chuẩn hóa như phương pháp BioBricks™, BglBricks và Golden Gate. Ngoài ra, kỹ thuật ghép chồng chéo không phụ thuộc vào trình tự như InFusion™, SLIC và Gibson assembly® (lắp ghép đẳng nhiệt) đang trở nên phổ biến đối với các tổ hợp lớn hơn, và việc liên kết ADN trong cơ thể ở nấm men và vi khuẩn *Bacillus* được thực hiện hiệu quả trong quá trình tạo ra nhiễm sắc thể.

BioBrick™: một đơn vị ADN với các trình tự 2 bên chuẩn hóa cho phép thực hiện lắp ghép bằng phương pháp giới hạn/nối đã được chuẩn hóa với chi phí rẻ và dễ thực hiện. Nhược điểm chủ yếu của phương pháp BioBrick™ là trình tự sọc dài 8 bp (BioBrick part) tương tự được tìm thấy ở mỗi đoạn giao nhau. Trình tự sọc này không xuất hiện ở các vị trí nhất định, đặc biệt là RBS (Vị trí gắn kết Ribosome). Vết sọc cũng là vấn đề trong quá trình tổ hợp các protein hợp nhất khi nó thực hiện mã hoá codon kết thúc theo trật tự.

Một phương pháp tiêu chuẩn khác là BglBricks được mô tả là sử dụng các trình tự khác nhau để lắp ghép và để lại dấu vết có độ dài nhỏ hơn 6 bp. Ưu điểm của BglBrick là sử dụng các enzym giới hạn hoạt động hiệu quả và được sử dụng thường xuyên, có các trình tự nhận dạng không bị chặn bởi 2 enzym methyl hóa ADN phổ biến nhất là Dam và Dcm.

Một số phương pháp lắp ghép khác không để lại vết sọc như trong OE-PCR (phản ứng khuếch đại gen hay phản ứng chuỗi polymerase chồng chéo kéo dài). Phương pháp này sử dụng các đoạn môi chuỗi phản ứng polymerase (PCR) có độ dài hơn 40 bazơ để tạo ra các điểm cuối tương đồng giữa các phân tử ADN khác nhau. Tính tương đồng sau đó được sử dụng để hỗ trợ kéo dài trong vòng lặp thứ hai của PCR giữa các sản phẩm ban đầu, và là cơ sở của hầu hết các kỹ thuật tổng hợp gen thông thường. Trình tự của các đoạn môi tương đồng cứ thế lắp lại, nối nhau, cho phép lắp ráp chuỗi trình tự được thực hiện theo tuần tự, hoặc thậm chí như một phản ứng song song. OE-PCR có khả năng tổ hợp không chỉ một gen mà còn cả những phân tử ADN dạng vòng plasmid (CPEC - circular polymerase extension cloning). Giống như tất cả các phương pháp PCR, quá trình lắp ráp gặp khó khăn khi các chuỗi trình tự lắp lại nhiều lần hoặc hàm lượng GC quá cao. Do những phương pháp này còn bị hạn chế về khả năng kéo giãn nên plasmid trở nên kém hiệu quả ở các kích cỡ lớn hơn và tỷ lệ lỗi PCR.

Gen tham gia các con đường chuyển hóa (liên kết gen tạo ra các con đường và công cụ chuyển hóa)

Thách thức trong lắp ráp ở quy mô lớn hơn đã dẫn đến phương pháp sử dụng các enzym giới hạn Loại II như **phương pháp tổ hợp Golden Gate**: kỹ thuật lắp ráp song song các cấu trúc liên mạch 1 bước - 5 phút - 1 bình phản ứng (one-pot, one-step five min technique). ADN được chèn vào một vectơ con thoi nhân bản đầu vào cung cấp các chuỗi trình tự nhận dạng Loại II ngay ở cả hai đầu của đoạn ADN. Quá trình sắp xếp có hệ thống diễn ra sau đó sẽ tạo ra tất cả các đoạn để lắp ghép song song với nhau ở những vị trí chưa được lắp ghép bổ sung. Phương pháp này cũng thích hợp để thực hiện tái giải trình tự nhiều đoạn.

Điều kiện tất yếu về vị trí không được lắp ghép có thể xuất hiện - vấn đề này có thể được giải quyết bằng công nghệ dựa trên oligo RARE (RecA-assisted restriction endonuclease), theo đó các oligo ngăn chặn trình tự cụ thể ngăn ngừa sự methyl hóa xảy ra trong cụm CpG của các vị trí sắp đặt của đoạn thông qua liên kết trung gian RecA đến các trình tự tương đồng.

Phương pháp lắp ghép chồng chéo: Các phương pháp này yêu cầu sử dụng các đoạn trình tự ADN để tham gia vào chuỗi trình tự chung có độ dài ít nhất 20 bp ở các đầu sẽ được nối. Trình tự này được xử lý trong ống nghiệm bằng các enzym thực hiện lắp ghép. Một số bộ kit hiện có sẵn trên thị trường như Gateway[®] (Life Technologies) và InFusion[®] (Clontech). Đặc biệt thích hợp cho phản ứng song song với một số đoạn ADN, những kỹ thuật này cũng thường được gọi là "nhai lại và ủ". Chúng hoạt động bằng cách tái sắp xếp một sợi ADN từ mỗi đầu tiếp xúc của một đoạn, để lại một sợi đơn chưa được ghép cặp có thể ủ với "đoạn chưa được lắp ghép" bổ sung của một đoạn dùng chung chuỗi chồng chéo. Thứ tự của các đoạn được xác định trước bởi trình tự xếp chồng.

Nhân bản USER và hợp nhất USER (uracil-specific excision reagent - thuốc thử loại trừ uracil) là một kỹ thuật nhân dòng đòi hỏi phải khuếch đại các mảnh PCR sử dụng đoạn mồi có kết hợp ít nhất một uracil. Kỹ thuật có thể lắp ghép liên mạch không để lại các vết nối. Hạn chế của phương pháp này là cần ít nhất một thymidine gần cuối chuỗi trình tự (thay thế bằng uracil), do đó nó không thực sự được xem là trình tự độc lập.

Ngoài ra còn một số phương pháp nhân dòng không phụ thuộc trình tự và enzym nối (SLIC: sequence- and ligation-independent cloning). Viện Craig Venter đã công bố một số phương pháp nhân dòng chồng chéo, trong đó toàn bộ hệ gen được lắp ráp trong ống nghiệm từ những đoạn có kích thước năm kb, được tổng hợp trực tiếp và thiết kế để tiếp nhận một trình tự chồng chéo có kích thước hơn 100 bp. Phương pháp lắp ghép đẳng nhiệt Gibson đòi hỏi sử dụng enzym ADN polymerase, T5 exonuclease và Taq ADN

ligase có độ chính xác cao và dự kiến nuôi cấy 1 lần duy nhất trong vòng 30 phút tại một mức nhiệt độ.

Zhang và các cộng sự (2012) đã mô tả cách thức lắp ghép nhiều đoạn ADN vào các phân tử ADN tái tổ hợp trong một phản ứng tái tổ hợp duy nhất trong ống nghiệm (SLiCE: Seamless Ligation Cloning Extract – Chiết tách nhân dòng nối liền mạch). Phương pháp này dựa trên chiết tách vi khuẩn từ chủng *Escherichia coli* phổ biến trong điều kiện phòng thí nghiệm với sự hỗ trợ của protein RecA-, có thể được tối ưu hóa thêm bằng kỹ thuật sửa đổi gen đơn giản và không để lại bất kỳ trình tự không mong muốn nào tại các điểm gắn kết. SLiCE cũng có khả năng tạo điều kiện tái tổ hợp giữa các đoạn ADN có chứa các kết nối dị loại hai bên và có khả năng xóa các chuỗi hai bên để tạo các nút kết nối chính xác tại các vị trí tái tổ hợp.

Con đường chuyển hóa tới bộ gen

Ở cấp độ này, các phản ứng lắp ghép song song trở nên cần thiết; cần phải xác định thứ tự lắp ghép.

TAR (Transformation Assisted Recombination cloning - Nhân dòng tái tổ hợp dựa trên biến đổi) là một giao thức thông dụng để thao tác ADN ở loài nấm men. Nó trải qua quá trình tái tổ hợp tương đồng trong quá trình biến đổi tế bào (spheroplast) nấm men và được sử dụng chủ yếu để kết hợp các bộ gen và ADN vào các vị trí cụ thể trong bộ gen của nấm men. Với một trình tự nhân dòng nhiễm sắc thể nấm men nhân tạo (YAC) và một chỉ thị chọn lọc trong một đoạn lắp ghép, có thể tổ hợp kết cấu tự nhân giống vòng tròn. Các enzym tái tổ hợp của men luôn hoạt động, do đó quá trình tổ hợp gen ở nấm men luôn cho kết quả rất chính xác và nó chấp nhận các cấu trúc rất lớn. Đối với lắp ráp ở cấp bộ gen, nấm men không phải là vật chủ tế bào duy nhất, *Bacillus* cũng được sử dụng.

Gibson và các cộng sự (2010) đã báo cáo quá trình thiết kế, tổng hợp và tổ hợp bộ gen của loài vi khuẩn *Mycoplasma mycoides* có kích thước 1,08-mega-base để tạo ra một loài vi khuẩn mới có tên gọi là JCVI-syn1.0 bắt đầu với thông tin trình tự bộ gen được số hóa và cấy ghép vào tế bào nhận *Mycoplasma capricolum* để tạo ra tế bào *Mycoplasma mycoides* mới được kiểm soát bởi nhiễm sắc thể tổng hợp.

Bằng cách kết hợp các phương pháp sử dụng enzym trong ống nghiệm và tái tổ hợp tại chỗ loài nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, bộ gen tổng hợp từ loài *Mycoplasma genitalium* được lắp ráp theo bốn giai đoạn từ đoạn gen chèn ban đầu có kích thước khoảng 6 kb.

Bộ gen vi khuẩn được nuôi cấy trong nấm men (sinh vật mô hình) không được methyl hóa và do đó không được bảo vệ khỏi hệ thống giới hạn duy nhất của tế bào nhận (khử prokaryotes của hệ thống giới hạn). Rào cản hạn chế này có thể được khắc phục

được bằng cách methyl hóa ADN cho với các metylase tinh khiết hoặc chiết xuất từ *Mycoplasma mycoides* hoặc *Mycoplasma capricolum*, hay đơn giản là bằng cách làm gián đoạn hệ thống giới hạn của tế bào nhận.

Thiết kế bộ gen *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 được dựa trên trình tự gen hoàn chỉnh có độ chính xác cao của các chủng phổ biến trong phòng thí nghiệm của phân loài capri GM12. 4. của vi khuẩn *Mycoplasma mycoides*.

Bộ gen *Mycoplasma mycoides* tổng hợp nguyên vẹn từ nấm men sMmYCp235 đã được cấy ghép vào tế bào nhận của *Mycoplasma capricolum*.

2.2.3. Sửa đổi ở mức khác ADN

Các axit amin không tự nhiên (NNAA- Non-Natural Amino Acids):

ADN là một biopolymer bền hóa học và cơ học hoạt động như một mã số và một bộ nhớ nhưng hầu như không có hoạt động enzym hoặc xúc tác. Tuy nhiên, tất cả các thành phần phiên mã và dịch mã cần thiết đều được mã hoá trong các gen, tức là ADN cũng là cơ sở cho các protein khi quá trình dịch mã thực hiện các tác vụ mong muốn trong một cơ thể.

Các tế bào nhân tạo sẽ là nơi chứa lý tưởng để chèn các mô-đun di truyền mới hoặc sửa đổi các tế bào hiện có. Với khả năng tạo ra một bộ gen cụ thể tổng hợp, có thể xác định một mã di truyền sửa đổi vì vậy cần thêm codon để kết hợp các axit amin không tự nhiên (NNAA) trong protein tế bào. Việc kết hợp số lượng lớn NNAA cho phép tạo ra các protein mới với các chức năng mới.

Các axit amin không tự nhiên được đưa vào các protein bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp tRNA và rRNA tiên hóa trực giao, tuy nhiên phương pháp này đã bị dừng sử dụng bởi hiệu quả liên kết thấp do sự cạnh tranh giữa các yếu tố nhận dạng codon hiện có đem lại. Danh mục các axit amin mà các tế bào sử dụng để tạo ra các protein có thể được mở rộng, sẵn có cho bất kỳ vật chủ được tái mã hóa.

Mặc dù đạt được nhiều tiến bộ trong việc mở rộng mã di truyền với hơn 70 NNAA được bổ sung thành công, cho đến nay, các phương pháp này gần như hoàn toàn dựa trên việc ghi lại mã bộ ba kết thúc UAG hiếm. Bởi vì tất cả 61 codon cảm quan được sử dụng bởi các tRNA hiện có mang theo 20 canonical axit amin đòi hỏi bổ sung thêm nhiều NNAA khác nhau vào protein trong cùng một tế bào. Biện pháp được đề ra là di chuyển qua bộ 3 codon hiện tại và sử dụng các tRNA với các bộ ba đối mã mở rộng có khả năng nhận biết được các codon bộ bốn. Tuy nhiên, hiệu quả của liên kết đạt được ở mức rất thấp, có thể do khả năng thích nghi với bộ 3 đối mã lớn hơn của ribosome bị hạn chế. Để giải quyết vấn đề này, các nhà nghiên cứu đã tạo ra các ribosome đột biến có thể sử dụng codon bộ bốn hiệu quả như các codon bộ ba.

Các NNAA có thể được tổng hợp với rất nhiều mạch bên. Những kỹ thuật này được áp dụng mở rộng cho nấm men, tế bào động vật có vú và sinh vật đa bào. Tuy nhiên, nhược điểm của kỹ thuật này là việc kết hợp NNAA bằng cách thay thế các codon tự nhiên nhất thiết phải cạnh tranh với các quá trình tự nhiên.

Xét một cách tổng thể, NNAA bộc lộ nhiều chức năng hóa học mới để có thể trực tiếp tham gia vào cơ chế enzym. Ví dụ: liên kết kim loại-ion, photoreactive axit amin, và axit amin photocaged. Một số ví dụ liên quan là axit amin đại diện cho một phiên bản sửa đổi sau quá trình dịch mã một axit amin tự nhiên, bao gồm sulfat, methyl hoá, nitrosylated và phosphoryl hóa (Marcheschi và cộng sự. 2013).

Sửa đổi ARN

ARN còn được sử dụng để lập trình các tế bào tổng hợp, phức tạp hơn nhiều so với tạo ra một tế bào ADN (Noireaux và cộng sự. 2011).

2.3. Xây dựng hệ thống sinh học từ các bộ phận

Phù hợp với các nguyên lý của kỹ thuật cổ điển, sinh học tổng hợp nhằm mục đích xây dựng hệ thống sinh học từ các thành phần cơ bản. Ở cấp ADN, các thành phần cơ bản là vùng gen khởi động, vùng vận hành, trình tự kích hoạt thượng nguồn (UAS), vị trí gắn kết ribosome (RBS), khung đọc mở (ORF), vùng kết thúc ... Các "bộ phận" này được kết hợp để tạo ra các mạch di truyền ngày càng phức tạp theo khung thiết kế hệ thống. Sinh học tổng hợp hiện nay tập trung chủ yếu vào việc xây dựng và tối ưu hóa các thiết bị điều chỉnh và các quá trình chuyển hóa. Việc tạo ra bộ gen mới từ các bộ phận là mục tiêu cuối cùng cho tương lai.

2.3.1. Điều chỉnh biểu hiện gen: các bộ phận và thiết bị

Mỗi bộ phận là một trình tự ADN riêng biệt thực hiện chức năng được định sẵn trong một mạch di truyền và tương thích với kỹ thuật lắp ghép. Gen là một khung đọc mở (ORF) kết hợp với tất cả các yếu tố điều chỉnh cần thiết để biểu hiện thành công. Gen chức năng hay "bộ phận phức hợp" thường bao gồm một vùng gen khởi động (promoter), vị trí bắt đầu quá trình dịch mã (RBS trong prokaryotes), protein mã hóa ORF và vùng kết thúc. Việc lắp ráp một gen từ các bộ phận riêng biệt của nó theo chức năng đòi hỏi quá trình theo trình tự. Một trong những tiến bộ cơ bản của sinh học tổng hợp là BioBrick™, một đơn vị ADN với các mạch hai bên được chuẩn hóa, cho phép tiếp nhận lắp ghép bằng phương pháp giới hạn/nối với chi phí rẻ, thao tác dễ thực hiện. Với BioBricks™, việc lưu trữ các bình chứa các bộ phận sinh học mô-đun có thể được dùng chung và lắp ghép dễ dàng theo nhiều tổ hợp khác nhau bởi một nhóm là hoàn toàn khả thi.

Con đường chuyển hóa là một nhóm các gen hoặc các operon (gen đa ORF) có thể thực hiện các chức năng liên quan. Các con đường chuyển hóa, thiết bị và hệ thống điều

chính có thể được sử dụng trong quá trình lắp ráp hợp nhất để tạo ra các bộ gen hoặc nhiễm sắc thể thiết kế tổng hợp cho các sinh vật tùy ý. Nghiên cứu trong lĩnh vực này đã được thực hiện và mang lại những kết quả ban đầu (Ellis và cộng sự. 2011).

Các yếu tố điều chỉnh giữ vai trò then chốt trong việc thiết kế các hệ thống có thể dự đoán được (Boyle và Silver 2009). Việc điều chỉnh hoạt động của gen ở nhiều mức độ trong các hệ thống sinh học có thể được thực hiện, bao gồm: sao chép, xử lý ARN, dịch mã, tương tác protein-protein và tương tác protein-chất nền. Tổ chức không gian và thời gian của các hệ thống kiểm soát này đảm bảo chức năng thích hợp của chúng. Cụ thể, các protein có thể tương tác với tế bào liên kết phù hợp bất kỳ không phụ thuộc vào khoảng tế bào. Protein tổng hợp có thể được tái sắp xếp để tạo ra trạng thái mới. Trong các hệ thống tổng hợp, việc tối ưu hóa quá trình chuyển hóa có thể được thực hiện ở nhiều quy mô (phân chia, protein - chất nền, lập phức hợp, chuyển đổi enzym-electron trong ty thể và lục lạp) (Agapakis và cộng sự. 2012).

Nhiều thành phần sinh học, như các trình tự đích cơ quan tế bào, vận chuyển xuyên màng và khe rỗng vi màng vi khuẩn (BMC), cần được đặc trưng hóa trong kỹ thuật nội bào hiệu quả. Các hệ thống chuyển hóa hoạt động theo các chiến lược khác nhau để kết hợp các tế bào, enzym và chất nền phù hợp theo thời gian và không gian. Biểu hiện gen có thể được kiểm soát ở các cấp độ phiên mã (vùng gen khởi động điều chỉnh, riboswitches phiên mã) hoặc dịch mã/hậu dịch mã, giúp đẩy nhanh động lực học. Các thành phần (bộ phận, thiết bị và hệ thống di truyền) và các công cụ điều chỉnh các thành phần này cần được thiết kế theo cách thức có thể dự đoán và kiểm soát (Seo và cộng sự. 2013).

2.3.2. Thiết bị di truyền

Thiết bị di truyền là sự kết hợp của các bộ phận thực hiện chức năng xác định. Dấu hiệu trong lĩnh vực này là một số thiết kế được lấy cảm hứng từ mạch điện tử, chẳng hạn như công tắc chuyển đổi gen, bộ tính giờ, bộ tạo dao động và bộ đánh giá logic (Purnick và Weiss 2009; Arpino và cộng sự. 2013). Chức năng hoạt động của chúng dựa trên việc kiểm soát quá trình sao chép, dịch mã hoặc xử lý sau dịch mã. Các thiết bị “phức tạp” lắp ráp từ các bộ phận mô-đun dễ phân biệt nhưng nó đòi hỏi phải dự đoán đầy đủ chức năng của chúng (Boyle và Silver 2009). Chúng có thể ít bền vững hơn các hệ thống tự nhiên, và các hệ thống điều hòa nội sinh có thể can thiệp vào chức năng của các thiết bị sinh học tổng hợp. Mặc dù có thể biết rõ từng bộ phận lắp ráp nhưng rất khó có thể dự đoán được nhiệm vụ hoạt động của chúng (Arkin và Fletcher 2006). Việc tạo ra các protein hoặc mạch gen mới có thể dẫn đến khả năng tương tác trực tiếp giữa các thành phần mới hoặc các tương tác gián tiếp thông qua ảnh hưởng của chúng đối với cơ thể ("vật chủ") mà chúng được đưa vào. Do thiếu sự đồng tiến hóa nên có thể xảy ra các phản ứng chéo

không lường trước. Các nhà nghiên cứu hy vọng rằng khả năng sống sót trong môi trường thế giới thực của sinh vật có bộ gen được lắp ráp là không cao (Arkin và Fletcher 2006).

Thiết bị kiểm soát quá trình phiên mã

Kiểm soát phiên mã của biểu hiện gen được thực hiện nhằm tối ưu hóa các hệ thống sinh học (sửa đổi vùng đệm giữa các trình tự ADN của các vùng gen khởi động nguyên thể và sử dụng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để đưa các đột biến vào toàn bộ vùng khởi động). Ngoài ra, các phương pháp vùng khởi động lai tổng hợp kết hợp vùng khởi động lõi với các yếu tố tăng cường bao gồm các kết hợp hoặc sao chép nối tiếp các trình tự kích hoạt thượng nguồn. Cường độ hoạt động của vùng khởi động có thể khác nhau tùy thuộc vào các trình tự 2 bên thượng nguồn và hạ nguồn của các khuôn đồng nhất (consensus boxes) và số lượng bản sao vùng khởi động. Một nghiên cứu mới được thực hiện đã chứng minh tầm quan trọng của việc cân bằng chính xác dòng chuyển hóa nhờ kiểm soát hiệu quả quá trình phiên mã để tạo ra phân tử đích. Ngoài ra, các dịch vụ sao chép nguyên mẫu nhanh như BIOFAB (<http://biofab.synberc.org>) được xây dựng và phát triển nhằm cung cấp cho các thư viện các yếu tố điều chỉnh đặc trưng, đồng thời tạo điều kiện sao chép nguyên mẫu các thiết bị tổng hợp bằng kỹ thuật nhân dòng và thử nghiệm tốc độ cao (Boyle và Silver 2012).

Nguyên mẫu của kiểm soát phiên mã là **bộ chuyển đổi ổn định kép** bao gồm hai vùng khởi động có khả năng sao chép các protein ức chế lẫn nhau và bị bất hoạt bởi các tác nhân gây cảm ứng khác nhau. Có một vùng khởi động cũng thực hiện sao chép gen chỉ thị, chẳng hạn như protein huỳnh quang xanh (GFP). Biểu hiện gen chỉ thị có thể bắt đầu bằng cách bổ sung tạm thời tác nhân gây cảm ứng đầu tiên hay kết thúc bằng cách bổ sung tác nhân gây cảm ứng thứ hai.

Thiết bị lắp ráp vùng gen khởi động và protein ức chế phức tạp hơn gồm có **bộ tạo dao động và bộ hẹn giờ phiên mã**. Bộ tạo dao động của quá trình phiên mã làm tăng và giảm biểu hiện gen chỉ thị theo nhịp điệu phụ thuộc vào nồng độ của hai hợp chất gây cảm ứng có trong môi trường. Với bộ hẹn giờ di truyền, biểu hiện gen chỉ thị có thể được bật hoặc tắt bằng cách bổ sung một tác nhân gây cảm ứng tạm thời, đồng thời cài đặt lại về trạng thái ban đầu sau một khoảng thời gian nhất định.

Thiết bị kiểm soát quá trình dịch mã

Các yếu tố điển hình của kiểm soát quá trình dịch mã là các **ribozyme tổng hợp**. Trong các thiết bị ARN, bản sao của một gen quan tâm mang một vùng phân tích tự động và các phân tử (aptamers) để nhận dạng các phối tử cụ thể. Liên kết một phối tử với aptamer ARN dẫn đến sự thay đổi cấu trúc trong vùng phân tích tự động. Vùng tự xúc tác hoạt hóa ức chế quá trình dịch mã bản sao chép. Các thiết bị ARN phản ứng với các chất

chuyển hóa phân tử thấp được gọi là **riboswitches**. Các thiết bị ARN phản ứng với đoạn ARN can thiệp nhỏ (siRNAs) được gọi là **riboregulator**.

Riboswitches được sử dụng để tạo ra các **bộ đánh giá logic** báo cáo việc có hay vắng mặt của một số phối tử đồng thời sử dụng logic Boolean AND/OR/NOT/NOR (VÀ/HOẶC/ KHÔNG/CŨNG KHÔNG). Những thiết bị này còn được gọi là cổng logic.

Thiết bị kiểm soát hậu dịch mã

Một ví dụ về thiết bị kiểm soát sau dịch mã là **hệ thống phosphoryl hóa protein giàn giáo**, protein giàn giáo lựa chọn protein cần thiết cho các quá trình phân bào cụ thể và ghép chúng lại với nhau. Trong thiết bị được thể hiện, cấu trúc giàn giáo được kích hoạt bởi quá trình phosphoryl hóa với sự có mặt của các tác nhân gây ức chế cụ thể, và quá trình kích hoạt gen khởi tạo biểu hiện gen chỉ thị GFP (Purnick và Weiss 2009).

Ứng dụng thiết bị điều chỉnh

Các thiết bị mô tả ở trên và nhiều thiết bị cơ bản khác đã được áp dụng đối với loài vi khuẩn *Escherichia coli* và nấm men. Những thiết bị này sử dụng các chất gây cảm ứng tiêu chuẩn, như IPTG, arabinose và anhydro-tetracycline và các gen chỉ thị tiêu chuẩn kiểm soát như GFP. Ngoài ra, còn có thể sử dụng các nguyên tắc tương tự để xây dựng hệ thống di truyền có thể phản ứng với tất cả các kích thích hóa học hoặc vật lý cũng như kiểm soát các quá trình phân bào khác nhau.

Trong nhiều nghiên cứu, các loài vi sinh vật được trang bị các thiết bị biểu hiện các gen chỉ thị đối với các chất gây ô nhiễm môi trường. Vi khuẩn cũng được lập trình để nhận diện một số đặc tính của khối u trên các cổng ADN cũng như xâm nhập vào các tế bào ung thư được xác định chuẩn xác. Thông tin nhân tạo giữa các quần thể tế bào thông qua biểu hiện có điều kiện của các chất chuyển hóa thiết yếu, các chất độc hại và các hợp chất cảm ứng như acyl homoserine lactone cũng được thiết lập (Purnick và Weiss 2009).

Một trong những ví dụ hiếm hoi về thiết bị di truyền được áp dụng trên thực vật là thụ thể nhân tạo đối với chất gây ô nhiễm môi trường TNT ở loài cây *Arabidopsis thaliana* báo hiệu tình trạng ô nhiễm môi trường do ảnh hưởng của sự suy giảm chất diệp lục. Điều quan trọng là các thiết bị di truyền còn có thể tích hợp vào các đường chuyển hóa sinh học tổng hợp để kiểm soát quy trình động lực công nghệ sinh học. Khả năng ứng dụng thử nghiệm của các thiết bị điều chỉnh di truyền hầu như là vô hạn.

Kỹ thuật máy móc phiên mã toàn cầu (gTME), tức là tạo ra thư viện các yếu tố sao chép đột biến, là một phương pháp đã được thực hiện ở cả sinh vật nhân nguyên thủy và sinh vật nhân thực. Sự kết nối giữa trình tự và chức năng của các yếu tố phiên mã đột biến rất khó dự đoán đột biến mới. Các kiểu mẫu được lựa chọn và sàng lọc để xác định và mô tả đặc tính mong muốn.

2.3.3. Thiết kế và tối ưu hóa các hệ thống sinh học tổng hợp

Quá trình xây dựng các thiết bị và con đường chuyển hóa tổng hợp bao gồm xác định đặc trưng mang tính định lượng của từng bộ phận, lập mô hình toán học, lắp ráp vật lý, biến đổi di truyền và cải tiến hệ thống dựa trên dữ liệu thực nghiệm và mô hình hóa.

Lập mô hình toán học

Các mô hình toán học hướng dẫn thiết kế mô-đun di truyền, thiết bị và con đường chuyển hóa thường có dạng phương trình vi phân mô tả phản ứng hóa học trong hệ thống. Hệ thống di truyền đơn giản bao gồm một chất ức chế biểu hiện thành phần, có thể bị bất hoạt bằng cách thêm vào một phân tử cảm ứng và điều chỉnh biểu hiện hoạt động của protein chỉ thị. Các phản ứng có thể mô tả như sau: liên kết vùng khởi động của ARN polymerase, tương tác giữa vùng khởi động - chất ức chế, tương tác nhân cảm ứng - chất ức chế, liên kết ribosome với mRNA và sự phân hủy mRNA và protein. Các phương trình tương ứng phải được biểu hiện đầy đủ thông tin định lượng. Hiện có rất nhiều công cụ phần mềm để thiết kế và phân tích các hệ thống di truyền.

Lắp ráp các đoạn

Một phương pháp lắp ghép các đoạn ADN rất phổ biến là phương pháp **pháp nhân vòng cổ điển dựa trên khả năng giới hạn và nối**. Quá trình giới hạn và nối được thực hiện theo tiêu chuẩn BioBrick™ và cho phép lắp ghép theo từng bước và theo tổ hợp. Nhược điểm chính là sẽ để lại các vết sẹo ngăn ở mỗi đoạn giao nhau và các vị trí nhận dạng các enzym giới hạn liên quan bị ngăn cấm trong các đoạn. Một tập hợp các phương pháp thay thế khác dựa trên kỹ thuật sắp xếp chồng chéo các trình tự giữa các phân tử lân cận, có thể kết nối bằng PCR nhân đôi, các kỹ thuật "nhai lại và ủ" như phương pháp nhân vòng không phụ thuộc trình tự và enzym nối (SLIC) hoặc phương pháp lắp ghép đẳng nhiệt Gibson.

Xác định đặc trưng và "căn chỉnh" các bộ phận

Do "các bộ phận" cơ bản sử dụng trong sinh học tổng hợp được lấy ra từ các nguồn khác nhau nên điều quan trọng nhất là phải có thông tin định lượng đặc trưng cho các tỷ lệ phản ứng và ngưỡng đầu vào - đầu ra của chúng. Để có thể hoạt động đồng bộ trong một hệ thống tổng hợp, các bộ phận và mô-đun phải được kết hợp với nhau. Quá trình tối ưu hoá hệ thống hoặc "căn chỉnh" này thường được thực hiện thông qua các bước lặp của mô hình toán học, thao tác di truyền, thử nghiệm thực nghiệm và sàng lọc mô hình.

Sinh học phân tử hiện đại cho phép thay đổi nhiều mặt. Ở cấp độ phiên mã, cường độ hoạt động của vùng khởi động có thể bị ảnh hưởng từ quá trình biến đổi trình tự của các vị trí liên kết ARN-polymerase và do đó gắn kết ái lực. Các vùng khởi động điều khiển có thể được điều chỉnh bằng cách biến đổi trình tự vận hành, điều này làm thay đổi cường độ của hoạt động tương tác giữa chất ức chế và ADN. Các nhà nghiên cứu đã chứng minh được rằng đột biến trong các trình tự ADN giữa các mô hình liên kết quan trọng có khả

năng tạo ra sự thay đổi của cường độ hoạt động của vùng khởi động, có thể bằng cách thay đổi cấu trúc ADN cục bộ (Arpino và cộng sự. 2013; Ellis và cộng sự. 2009).

Ở cấp độ dịch mã, có thể kiểm soát tính hiệu quả của quá trình lựa chọn các ribosome bằng cách biến đổi trình tự của các *vị trí gắn kết ribosome* (RBS). Bên cạnh đó, có thể cải thiện tốc độ dịch mã của gen mã hóa protein bằng cách tối ưu hóa codon - đó là khả năng tạo ra một trình tự mã hóa cùng một protein, nhưng tránh các codon hiếm. Đồng thời, tuổi thọ của bản sao mRNA có thể kiểm soát bằng cách thay đổi cấu trúc thứ yếu của nó trong các vùng không được dịch mã khiến nó ít nhiều dễ bị tác động bởi RNases.

Tương tự, quá trình *phân hủy protein* có thể điều chỉnh bằng cách bổ sung các thể phân hủy. Đối với hoạt động của enzym, có thể tạo ra các đột biến với độ đặc hiệu cơ chất biến đổi hoặc khả năng chịu nhiệt (Arpino và cộng sự. 2013).

Quá trình sửa đổi trình tự ngẫu nhiên trong các đơn vị ADN có thể được thực hiện bằng cách áp dụng các kỹ thuật khác nhau như việc sử dụng các polymerase dễ bị lỗi trong quá trình PCR hoặc bằng cách tổng hợp với trình tự thoái hóa. Thư mục các bộ phận đa dạng thu được được mô tả trong các hệ thống thử nghiệm và các phiên bản với đặc tính đầu vào và đầu ra tối ưu và tỷ lệ phản ứng có thể được lựa chọn cho nhiều ứng dụng khác. Mô hình toán học hỗ trợ quá trình này rất nhiều. Ví dụ, Ellis và cộng sự (2009) đã tạo ra một thư mục các vùng gen khởi động và một mô hình mô tả các biểu hiện hoạt động và ngưỡng ức chế khác nhau. Dựa trên mô hình này, các nhà sản xuất có thể chế tạo thiết bị với trạng thái hoạt động có thể định lượng và đoán trước được. Một công cụ phần mềm phổ biến được thiết kế nhằm tối ưu hóa RBS là máy tính RBS có khả năng dự đoán cường độ liên kết ribosome của các trình tự Shine-Dalgarno của tế bào nhân nguyên thủy.

Số bản sao chép

Số bản sao gen là yếu tố làm tăng hoặc giảm biểu hiện hoạt động của một protein trên một khoảng tuyến tính không hoàn chỉnh. Tương tự, sự nhân lên của các chất ức chế hoặc hoạt tính gắn kết các vị trí thể hiện mức độ tác động đến biểu hiện hoạt động của gen theo cách dự đoán được.

Số bản sao gen cấu trúc plasmid – borne có thể dễ dàng được điều chỉnh bằng cách thay đổi nguồn gốc của bản sao để sửa đổi số bản sao plasmid. Tuy nhiên, việc duy trì số lượng plasmid ngày càng tăng làm gia tăng áp lực chuyển hóa của tế bào chủ. Có thể chèn các bản sao song song lặp đi lặp lại của gen hoặc các yếu tố điều khiển vào cùng plasmid hoặc nhiễm sắc thể (Arpino và cộng sự. 2013; Xu và cộng sự. 2012).

Mô-đun hóa hệ thống di truyền (MMME)

Con đường chuyển hóa đa gen có thể được cải thiện một cách có hệ thống bằng kỹ thuật chuyển đổi mô-đun đa biến (MMME). MMME tập hợp các gen có cùng tính chất

vào các mô-đun, nghĩa là vào các operon tổng hợp. Biểu hiện hoạt động của các nhóm gen này có thể được điều chỉnh thành một đơn vị duy nhất, sử dụng hộp công cụ cường độ hoạt động của vùng gen khởi động và RBS, số lượng bản sao ... Điều này giúp đơn giản hoá việc điều chỉnh của các gen, từ đó loại bỏ các tắc nghẽn và tối đa hoá con đường chuyển hóa. Một ví dụ tiêu biểu của việc sử dụng kỹ thuật MMME là nghiên cứu nhằm tối ưu hóa con đường chuyển hóa terpenoid tổng hợp để tổng hợp taxol-precursor taxadiene ở *Escherichia coli*. Mười gen của nguồn vi khuẩn và thực vật được sắp xếp thành hai mô-đun với mức độ biểu hiện hoạt động tương đương. Sử dụng phương pháp này, các nhà khoa học chỉ cần xây dựng 32 chủng để xác định một biến thể với lượng taxadiene tăng gấp 15.000 lần, trong khi phương pháp biến đổi và sàng lọc tổ hợp của 10 gen riêng biệt đòi hỏi phải xây dựng 10.000 chủng. Các xương sống plasmid mô-đun cho phép tạo ra song song các biến thể con đường chuyển hóa được định hình khác nhau trong một số chu kỳ nhân dòng tạo thuận lợi cho MMME (Xu và cộng sự. 2012).

Sửa đổi đồng thời và sàng lọc tổ hợp nhiều gen (MAGE)

Để tạo ra được một kiểu gen chất lượng cao, cần phải cùng lúc điều chỉnh một số gen. Quy trình thực hiện kỹ thuật ghép gen tự động đa môi phát triển thời gian gần đây đã tạo ra sự đa dạng di truyền bằng cách cùng lúc điều chỉnh một số vị trí di truyền trên nhiễm sắc thể của một tế bào đơn lẻ hoặc trên một quần thể tế bào. Khả năng của MAGE đã được chứng minh trong nghiên cứu của Wang và cộng sự, trong đó, mục tiêu tham gia tổng hợp terpenoid của tất cả 20 gen ở loài *Escherichia coli* là nhằm thay đổi quá trình sinh tổng hợp lycopene sắc tố tetraterpene. Chỉ trong thời gian ngắn, những tiến bộ đáng kể đã đạt được. Tuy nhiên, quá trình sàng lọc tổ hợp 20 gen đòi hỏi thực hiện kiểm thử 100.000 đột biến. Do đó, MAGE thường được áp dụng để tạo ra các sản phẩm cuối cùng với tính chất so màu hoặc các tính chất khác được đánh giá cao trong các cuộc kiểm tra chất lượng.

Phân tích dòng chuyển hóa

Được bổ sung số lượng gen, protein và các chất chuyển hóa tích lũy trong các cơ sở dữ liệu công nghệ sinh học, trọng tâm của kỹ thuật chuyển hóa đã chuyển từ làm xáo trộn (perturb) các con đường chuyển hóa riêng rẽ tới thao tác trên toàn bộ tế bào để hình thành sản phẩm tối ưu hóa. Con đường chuyển hóa đích được xem xét trong phạm vi toàn hệ thống chuyển hóa của tế bào chủ. Điều này cho phép giải quyết sự cạnh tranh với các con đường chuyển hóa nguyên thể, sự tích tụ các sản phẩm phụ ức chế và các hiện tượng tương tác khác.

Phân tích cân bằng dòng (FBA) là một phương pháp mô phỏng được sử dụng phổ biến trong kỹ thuật chuyển hóa tổng hợp của các sinh vật được mô tả chi tiết như vi khuẩn *Escherichia coli*. FBA cũng được sử dụng để mô tả hệ thống chuyển hóa của một

tế bào trong ma trận hợp thức. Thông tin về số liệu thu thập từ dữ liệu sinh hóa thực nghiệm và phân tích so sánh gen mã hoá enzym của các sinh vật khác nhau sắp xếp hoàn toàn theo thứ tự. FBA dự đoán dòng chuyển hóa, nghĩa là tốc độ chuyển hóa, và giúp tối đa hóa các chức năng mong muốn. Điền hình, Xu và cộng sự (2011) đã sử dụng phương pháp FBA để xác định một bộ dữ liệu tối thiểu cho phép thực hiện can thiệp cần thiết vào gen di truyền nhằm chuyển hướng dòng cacbon trong *Escherichia coli* tới malonylCoA để tổng hợp flavonoid.

Để điều chỉnh động lực các dòng chuyển hóa, có thể sử dụng các thiết bị điều chỉnh để nhận biết sự tích tụ các chất chuyển hóa, từ đó tăng cường điều chỉnh các phản ứng chuyển hướng các dòng theo số lượng dự kiến (Zhang và cộng sự. 2012).

Phương pháp phân tích hệ thống chuyển hóa có thể được sử dụng để dự đoán các yêu cầu chuyển hóa tối thiểu cho một tế bào trong các điều kiện nhất định. Bằng việc áp dụng phương pháp FBA cho các hệ thống chuyển hóa ngẫu nhiên được tạo ra tự động từ các cơ sở dữ liệu phản ứng hóa sinh, Bilgin và Wagner (2012) đã tính toán rằng một tế bào tổng hợp 20 phân tử sinh khối từ 20 nguồn cacbon thay thế cần tối thiểu 260 phản ứng. Tính trung bình, để thu được một nguồn cacbon bổ sung cần thực hiện hai phản ứng phụ; để thu được một sản phẩm bổ sung cần thực hiện ba phản ứng phụ.

2.3.4. Tiêu chuẩn hoá các bộ phận và mô-đun di truyền

Kỹ thuật thao tác gen dựa trên tiêu chuẩn hoá. Tiêu chuẩn đối với các bộ phận và phương pháp di truyền là yếu tố cần thiết để các nhà sinh học tổng hợp xây dựng dựa trên các kết quả nghiên cứu của nhau và để tạo một quy tắc mới nhất cho sinh học tổng hợp.

Một phương pháp đề cập tới tiêu chuẩn hóa trong sinh học tổng hợp là khái niệm BioBrick™. BioBrick™ đưa ra một tập hợp nguồn mở của các bộ phận và mô-đun sinh học đặc trưng. Phương pháp BioBricks™ được thực hiện bởi quy trình giới hạn-nội và tất cả các bộ phận BioBrick™ đều được trang bị các vị trí giới hạn tương thích ở các đầu. Các nhà nghiên cứu đang xây dựng các chỉ số để mô tả định lượng của các bộ phận sinh học, ví dụ: PoPs (thao tác polymerase trên giây-polymerase operations per second) đối với các bộ điều khiển phiên mã hoặc RiPS (Khởi tạo ribosome trên giây-ribosomal initiations per second) cho các bộ điều chỉnh dịch mã. Có thể thấy rằng BioBrick™ là cơ sở thúc đẩy khả năng đổi mới sáng tạo trong sinh học tổng hợp thông qua các cuộc thi máy móc thiết bị di truyền quốc tế (iGEM) cho sinh viên.

BioBricks™: Khối cấu trúc cơ bản của sinh học tổng hợp

Trong sinh học tổng hợp, phương pháp chuẩn hóa các yếu tố di truyền được sử dụng để tạo ra các đơn vị điều chỉnh di truyền mới là một vấn đề then chốt. Mục tiêu quan trọng là nhằm đơn giản hóa quy trình kỹ thuật sinh học. Để tăng cường phổ biến kiến thức thực tiễn đạt được trong lĩnh vực sinh học tổng hợp, thúc đẩy quá trình phát triển

của các mạch điều khiển sinh học mới, cải thiện khả năng lặp lại của các kết quả đã thu được, tăng tính minh bạch trong lĩnh vực mới nổi, tổ chức iGEM (cuộc thi máy móc thiết bị di truyền quốc tế) đang thúc đẩy việc tiếp cận mở đối với một trong nhiều bộ phận sinh học được chuẩn hóa này. iGEM hoạt động như một nền tảng giáo dục và có tính chất mở đầu nhằm bao quát toàn bộ các khía cạnh của sinh học tổng hợp, bao gồm các cuộc thi quốc tế dành cho học sinh trung học và sinh viên đại học trong lĩnh vực có tính cạnh tranh cao này để phát triển công nghệ. Là bước đầu tiên hướng tới việc hợp lý hóa quy trình và tiêu chuẩn hóa thiết kế trong sinh học tổng hợp, iGEM đang truyền bá mạnh mẽ khái niệm các bộ phận sinh học được tiêu chuẩn hoá bằng BioBricks™ để có thể dễ dàng sử dụng và phân phối để tạo ra các phức hợp chức năng di truyền mới.

Bảng tóm tắt BioBricks™

Một chuỗi ADN mã hóa chức năng sinh học, chẳng hạn: vùng gen khởi động, vùng gen kết thúc, vị trí liên kết ribosome, domain protein, chuỗi mã hóa protein ... được gọi là một "bộ phận cơ bản".



Mỗi bộ phận cơ bản là một đơn vị chức năng không thể chia nhỏ hơn của ADN. Một ví dụ điển hình cho một bộ phận cơ bản là vùng khởi động T7 (5'taatcagactcactatagggaga3'; order code BBa_I719005) hoặc vùng khởi động điều tiết phage lambda cI (5'taacaccgtgcgtgtgactattttacctctggcgggtgataatggtgc3'; BBa_R0051).



Bộ phận phức hợp là một đơn vị chức năng của ADN bao gồm hai hoặc nhiều phần cơ bản xếp chồng lên nhau. Ví dụ, một bộ phận phức hợp là sự tổ hợp một vị trí liên kết ribosome, một vùng mã hóa protein và một vùng kết thúc lắp ráp với nhau trên một đoạn ADN tiếp giáp tạo thành một phức chất hoạt tính chức năng (ví dụ: BBa_I13507).



Thiết bị là một biến thể của bộ phận phức hợp có khả năng thực hiện chức năng trung gian trong môi trường tế bào. Một ví dụ về loại thiết bị này là sự tổ hợp của phần cơ bản BBa_R0051 với phần tổng hợp BBa_I13507.

Tiêu chuẩn BioBricks™

"BioBricks™" là các bộ phận sinh học được chuẩn hóa (cơ bản và tổng hợp), phù hợp với tiêu chuẩn lắp ghép BioBrick™. Tuân theo tiêu chuẩn này đảm bảo tính tương thích giữa các bộ phận và/ hoặc với các túi chứa plasmid BioBrick™ và cho phép bất kỳ bộ phận mới được lắp ghép sẵn sàng cho quá trình tái tổ hợp với các bộ phận khác gắn liền với tiêu chuẩn lắp ghép BioBrick™ mà không cần thực hiện thêm thao tác di truyền. Nhìn chung, tiêu chuẩn lắp ghép BioBrick™ tập trung vào các chuỗi mục tiêu enzym giới hạn thích hợp, các vị trí nhân dòng tương thích trong các vectơ vận chuyển và các chuỗi

xương sống thích hợp. Phương pháp này cho phép các nhà khoa học tập trung vào việc thiết kế các chức năng mới thay vì giải quyết các vấn đề kỹ thuật liên quan đến các thao tác nhân dòng và di truyền.

Dựa vào BioBricks™ có sẵn, cộng đồng khoa học có thể tự tái tổ hợp để tạo ra các thực thể di truyền mới. Dữ liệu về BioBricks™ được thu thập và chia sẻ thông qua nền tảng internet Registry of Standard biological Parts (Đăng ký các bộ phận sinh học tiêu chuẩn). Các mẫu vật lý của các bộ phận cơ bản và bộ phận phức hợp có thể được tìm thấy trong Registry of Standard Biological Parts (Đăng ký các bộ phận sinh học tiêu chuẩn) (= Kho lưu trữ và đăng ký).

Các kiểu bộ phận có trong Kho đăng ký BioBrick™ (trích từ iGEM (2014)).

Bộ phận BioBrick™	Mô tả
Vùng khởi động (promoter)	Vùng huy động cho máy phiên mã các vùng gắn kết Polymerase ARN
Vị trí gắn kết Ribosome (RBS)	Vị trí trên mRNA bắt đầu dịch gắn kết ribosome
Miền protein (Protein domains)	Mã hóa vùng chức năng của chuỗi protein
Chuỗi mã hóa protein (Protein coding sequences)	Mã hóa chuỗi axit amin của protein
Đơn vị dịch (phiên mã) (Translational units)	Đơn vị phiên mã gồm vị trí gắn kết và chuỗi mã hóa protein. Chúng bắt đầu ở vị trí khởi động phiên mã, RBS, và kết thúc với vùng kết thúc phiên mã, codon dừng.
Vùng kết thúc (Terminators)	Tín hiệu dừng phiên mã ở cuối gen hay operon
ADN (DNA)	Các phần ADN cung cấp chức năng cho bản thân ADN. Các phần ADN bao gồm các vị trí nhân bản, seọ, vị trí gắn kết ban đầu, khoảng trống, vị trí tái tổ hợp, thành phần chuyển kết hợp, transposons, origami, và aptamers.
Khung xương sống plasmid (Plasmid backbones)	Một khung xương sống plasmid được định nghĩa là chuỗi plasmid bắt đầu với hậu tố BioBrick™, bao gồm nguồn gốc sao chép và marker kháng kháng sinh, và kết thúc bằng tiền tố BioBrick™.
Plasmids	Plasmid là một phân tử ADN có cấu tạo hình tròn, thường chứa một vài nghìn cặp base sao chép trong tế bào độc lập với ADN nhiễm sắc thể.
Primers	Primer là một chuỗi DNA đơn sợi ngắn được sử dụng làm điểm xuất phát để khuếch đại PCR hoặc sắp xếp. Mặc dù primer thực tế không có sẵn qua phân bố Registry, nhưng các chuỗi primer thường được sử dụng bao hàm.
Các phần tổng hợp (Composite parts)	Các phần tổng hợp là tổ hợp của 2 phần BioBrick™ hoặc nhiều hơn.

III. ỨNG DỤNG SINH HỌC TỔNG HỢP

Sinh học tổng hợp có rất nhiều ứng dụng thực tế tiềm năng. Nó được xem như là một giải pháp xử lý các vấn đề liên quan đến kỹ thuật tế bào và mô, liệu pháp gen, các vật liệu sinh học, phân tích sinh học và tổng hợp sản phẩm tự nhiên. Ngoài ra, người ta tin rằng phương pháp này tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình sản xuất hàng loạt các hợp chất có ích và các hóa chất bao gồm thuốc, nhiên liệu sinh học..., đóng vai trò then chốt trong phát triển công nghệ xử lý sinh học, tăng năng suất cây trồng, hướng đến sản xuất các

thành phần thực phẩm mới và cải thiện sức khỏe con người. Nếu được thiết kế cẩn thận, nó có khả năng giảm thiểu các tác động không mong muốn (như sản xuất bất kỳ chất không mong muốn nào có thể làm giảm sản lượng hoặc ức chế các quá trình chuyển hóa), giảm chi phí năng lượng cho tế bào và thiết lập quá trình chuyển đổi tốt từ chất nền tới sản phẩm mong muốn.

Những nỗ lực chủ yếu nhằm ứng dụng tiềm năng sinh học tổng hợp bao gồm sản xuất nhiên liệu sinh học như ethanol, nhiên liệu tảo, hydro sinh học và các tế bào nhiên liệu vi sinh vật; Xử lý sinh học như xử lý nước thải, khử mặn nước, phân hủy chất thải rắn và thu hồi khí CO₂; Sản xuất các vật liệu sinh học như nhựa sinh học, hóa chất số lượng lớn, dược phẩm, hương liệu, nước hoa và các hợp chất cho mỹ phẩm; Và cuối cùng là sản xuất các tế bào và sinh vật mới, bao gồm cả việc tạo ra các tiền tế bào và sinh học vũ trụ.

3.1. Sinh học tổng hợp ở vi sinh vật

Quá trình thiết kế thiết bị hoặc hệ thống được thực hiện trong tế bào chủ cụ thể. Các loài vi sinh vật mô hình chủ yếu thực hiện các hoạt động cơ bản trong sinh học tổng hợp (kỹ thuật chuyển hóa và xây dựng bộ gen tối thiểu) gồm có vi khuẩn *Escherichia coli* và *Saccharomyces cerevisiae*. Các nhà khoa học đã phát triển các cơ sở chế tạo (biofabs) để xây dựng, mô tả và chuẩn hóa các thành phần sinh học cho các sinh vật nền tảng được sử dụng rộng rãi. Ưu điểm chính của việc tập trung vào một số loài sinh vật rõ ràng sẽ gồm có: tích lũy nhiều kiến thức, cho phép dự đoán tốt hơn các kết quả của chiến lược kỹ thuật.

Các loài vi khuẩn, đặc biệt là *Escherichia coli* hoặc nấm men, có thể được sử dụng trong nghiên cứu thực nghiệm với vai trò vật chủ để tái tạo sinh học tổng hợp. Phương pháp này mang lại những lợi ích đáng kể so với sản xuất, ví dụ như loài chủ thực vật tự nhiên hoặc các chiến lược tổng hợp hóa học, điều này có thể bị cản trở bởi sự chậm phát triển của động học và các mức độ tự nhiên thấp. Các công ty thiết kế các chủng (ví dụ *Escherichia coli* Clean Genome[®], Scarab Genomics) có "tính ổn định gen được cải thiện, tính hiệu quả của chuyển hóa được nâng cao và năng suất sản xuất được cải thiện" với mục đích tạo ra nền tảng sản xuất hiệu quả. Các đặc trưng mong muốn đạt được bằng cách loại bỏ các gen không cần thiết, các phần tử trình tự chèn (IS), ADN tái tổ hợp/di động, các loài virus lạ, các gen độc tính và các chủng này được sử dụng như một nền tảng để tối ưu hóa các quá trình sản xuất protein trị liệu, plasmid ADN và vắc-xin.

Saccharomyces cerevisiae thích ứng tốt trong điều kiện công nghiệp, vì vậy nó được sử dụng rộng rãi trong sản xuất công nghiệp như một "giải pháp dùng ngay" (plug and play).

Đáng chú ý là cả *Escherichia coli* và *Saccharomyces cerevisiae* là những sinh vật mô hình quan trọng với kho dữ liệu từ các nghiên cứu cơ bản có sẵn, ấn tượng và đảm bảo. Các nhà khoa học đã xây dựng các mô hình toán học cho hệ thống sinh học cho phép mô hình hóa sự tương tác giữa tất cả các thành phần trong hệ thống. Ứng dụng của công cụ sinh học tổng hợp đã được sử dụng đối với cả hai loài này. Hạn chế chủ yếu là thiếu các công cụ chuyên hóa và sinh học quan trọng - ví dụ: Các đặc tính quang hợp hoặc khả năng biểu hiện các gen lớn của động vật có vú thể hiện việc cắt bỏ và sửa đổi sau dịch mã liên quan đến nhiều gen dẫn đến tạo ra một sự biến đổi có hệ thống rộng lớn đến quá trình sinh học của các sinh vật.

Do sự phức tạp này, chúng ta rất khó thiết kế với một trong hai chủng vi khuẩn *Saccharomyces cerevisiae* hoặc *Escherichia coli*. Một loài vi khuẩn khác có thể thỏa mãn như là nhà máy tế bào cơ sở là vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum*. Nó đã được đề xuất như là một sinh vật mô hình cho sinh học tổng hợp vì nó có khả năng sản sinh ra hàng loạt các chất hóa học và vật liệu có giá trị, và nó đã được ứng dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp sản xuất các axit amin (Woo and Park 2014). Đa số phương pháp tối ưu hóa *Corynebacterium glutamicum*, bao gồm sự phát triển các phần ADN tiêu chuẩn, các phần ADN/ARN, và các thiết bị (ví dụ như các chất chuyển hóa cảm biến) hiện vẫn còn là vấn đề tranh cãi. Nhìn chung, sự phát triển của chủng vi khuẩn là một ứng dụng quan trọng đối với sinh học tổng hợp trong phạm vi vi khuẩn (ví dụ như tạo ra các dòng vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* tối ưu cho quá trình sản xuất các axit amin hoặc thậm chí là thiết lập các chủng vi khuẩn cơ sở đa dụng).

Các ứng dụng tiềm năng thuộc môi trường sau đây của các vi sinh vật đã được xác định trong Công ước Đa dạng Sinh học (CBD) (2014); các lợi ích được mong chờ nhất là chúng có thể cung cấp các công cụ có hiệu quả cao hơn, ít chất độc hại hơn cho công nghệ xử lý sinh học. Điều này sẽ ảnh hưởng tích cực đến tính đa dạng sinh học vùng (CBD 2014):

- tăng cường khôi phục lại các chất kim loại mỏ và hỗ trợ xử lý dòng nước thải axit mỏ bằng phương pháp sinh học.
- thiết kế các cảm biến sinh học toàn bộ tế bào có khả năng nhận biết được sự hiện diện của một tín hiệu nào đó, chẳng hạn như arsen trong nguồn nước sinh hoạt.
- thiết kế bộ cảm biến arsen sinh học có thể dùng cho các khu vực sản xuất mỏ ở các nước đang phát triển, bằng cách dùng các vi khuẩn *Escherichia coli* đã được kết đồng để làm biến màu khi có sự hiện diện của arsen.
- điều tiết vi khuẩn *Escherichia coli* tiết ra auxin, một loại hormone thực vật có khả năng kích thích sự tăng trưởng của rễ cây.

- dùng vi khuẩn bao bọc lớp bên ngoài các hạt giống được trồng ở các khu vực có nguy cơ bị sa mạc hoá.

- phân hủy chất diệt cỏ nhờ tái lập trình "*Escherichia coli*"

3.2. Sinh học tổng hợp với các loài khác

Ngoài vật chủ là các vi khuẩn và nấm men ra, còn có nhiều nỗ lực ứng dụng các vật chủ khác nữa. Ví dụ: sản xuất tơ nhện (protein lụa kéo) bằng sữa của chuột chuyển gen. Các vật chủ là động vật nuôi cho thấy hiệu quả hơn so với sự biểu hiện và tính đồng nhất của một loài vi khuẩn nào đó.

Gần đây, sinh học tổng hợp cũng đã được đề xuất như là các chiến lược mới cung cấp cho các ứng dụng điều trị, chẳng hạn như các mạch gen sẽ được lắp ráp vào các thiết bị cảm biến sinh học. Các mạch thiết kế này sẽ theo dõi, định lượng và chữa bệnh bằng khả năng cảm biến các tín hiệu bệnh tật, tạo ra và giải phóng phân tử điều trị theo yêu cầu. Một phát triển khác gần đây đã nhằm mục tiêu đến việc điều chỉnh lại gen gây ảnh hưởng đến khả năng sinh sản. Các ứng dụng tiềm năng là loại trừ được các căn bệnh nguy hiểm do muỗi gây ra như bệnh sốt rét và sốt xuất huyết, giảm thiểu sự phát triển của thuốc phòng trừ các vật gây hại và thuốc trừ sâu, và tiêu diệt tận gốc các loài xâm lấn địa phương. Tuy nhiên, sự phát triển này có tác động quan trọng đến khía cạnh môi trường và an ninh, và quản lý rủi ro.

3.3. Sinh học tổng hợp trong các loài thực vật

Các con đường chuyển hóa tổng hợp được thiết kế để biểu hiện trong các vật chủ dị hợp, đặc biệt là các vi sinh vật. Tuy nhiên, đối với một loạt các ứng dụng, các loài thực vật sẽ đáp ứng được các yêu cầu có liên quan, ví dụ như để sản xuất các hợp chất có quy mô công nghiệp hoặc dễ dàng nhắm đích các vách tế bào để sản xuất sinh khối hiệu quả hơn. Cùng với các tiến bộ trong công nghệ sinh học thực vật gần đây, lợi ích thực tế thu được từ các phương pháp sinh học tổng hợp đã được ứng dụng thành công bởi cộng đồng công nghệ sinh học vi sinh vật. Đặc biệt là các kỹ thuật lắp ráp ADN cũng đã được các nhà nghiên cứu về thực vật học thông qua. Tuy nhiên, sự phát triển trong lĩnh vực sinh học tổng hợp ở thực vật bị chậm hơn so với các hệ thống vi sinh vật.

Đối với lĩnh vực thực vật, *Arabidopsis thaliana* là sinh vật mẫu. Nó chứa rất nhiều thông tin về chức năng gen hoặc các con đường chuyển hóa và điều tiết gen đã được tạo ra bởi các nghiên cứu cơ bản. Vì vậy, nó được xem như là loài thực vật có giá trị tương đương với *Escherichia coli* hoặc các loại men, và có thể sử dụng nó như một sinh vật nền.

Cho đến nay, kiến thức về các gen thực vật nói chung còn hiếm và do đó cũng rất ít kiến thức liên quan đến các con đường chuyển hóa tổng hợp sinh học thực vật. Vì thế, khả năng thao tác của chúng chỉ giới hạn ở các gen nhắm đích đã được chọn lọc và có

đặc điểm tốt. Ngoài ra, sự biểu hiện quá mức trạng thái bền của các gen chuyển gen làm hạn chế việc tái cấu trúc các con đường chuyển hóa sinh hóa phức tạp (Giuliano 2014). Do đó, điều quan trọng là phải hiểu rõ được các enzym có các đặc trưng và các yếu tố hóa học quyết định tác động đến các đặc tính chức năng. Các phương pháp thành công của sinh học tổng hợp bao gồm việc thiết lập phổ phân tích các phân tử phiên mã của các loài thực vật đã được lựa chọn để chọn lọc các gen (hoặc các bộ phận) nổi bật mà sẽ được dùng để tập hợp các con đường chuyển hóa tổng hợp. Chỉ khi giải mã được sự phức tạp của chức năng điều tiết gen mới có thể đạt được các kết quả nghiên cứu sinh học tổng hợp cuối cùng, tức là việc điều chỉnh những thay đổi vượt quá giới hạn của sự biến đổi tự nhiên. Các báo cáo về phương pháp tiếp cận sinh học tổng hợp trong thực vật hiện chỉ giới hạn trong các phân tử và thiết bị đóng ngắt điều tiết tổng hợp cho việc thao tác biểu hiện gen và điều chỉnh mạng lưới tín hiệu theo không gian và thời gian (Cabello và cộng sự, 2014). Mặc dù đã đạt được một số thành công, nhưng việc chuyển đa gen vẫn còn khó khăn.

Những thách thức lớn trong áp dụng cụ thể cho lĩnh vực cây trồng bao gồm khả năng dự đoán lựa chọn các phương pháp tiếp cận bằng cách thiết lập số lượng gen để thao tác; cũng như việc xác định các tương tác tiềm năng và phương thức tương tác. Thách thức của lĩnh vực sinh học tổng hợp trong phạm vi các loài thực vật bao gồm tạo ra các mô hình tích hợp để dễ dàng dự đoán các công nghệ kỹ thuật. Đối với vấn đề này, thành phần quan trọng phải đồng nhất với cách thức các mạng lưới điều trình của thực vật phản ứng lại với các thay đổi.

Cabello và cộng sự (2014) nhấn mạnh những tiến bộ trong sinh học tổng hợp thực vật bao gồm sự phát triển của các yếu tố kiểm soát tổng hợp, thiết bị chuyển mạch cho thao tác biểu hiện gen và xây dựng các mạng tín hiệu theo không gian và thời gian, tạo thành công con đường chuyển hóa tổng hợp để tạo ra các alkaloids halogen hóa trong vi khuẩn *Catharanthus roseus* và tái lập vị trí của con đường chuyển hóa toàn bộ enzym cytochrome P450 monooxygenase (*Cytochrom P450* là hệ thống enzym thuộc nhóm *monooxygenase* có trong hầu hết các cơ thể sống) từ mạng lưới nội chất, là một hệ thống các xoang và túi màng nằm trong tế bào nhân thực đến chloroplast (lạp lục, hay chính là bào quan, tiểu đơn vị chức năng trong tế bào thực vật và tảo). Ngoài ra còn bao gồm các báo cáo mô tả sự phát triển của bộ cảm biến sinh học auxin hoặc thiết kế của con đường truyền tín hiệu tổng hợp, cho phép phát hiện mối liên kết một chất chuyển hóa với sự biểu hiện các gen mục tiêu.

3.3.1. Lắp ráp các con đường chuyển hóa thực vật trong các vật chủ khác loài

Sử dụng vật chủ khác loài phải hỗ trợ sự tiếp cận nhanh và hiệu quả hợp chất mong muốn. Việc điều chỉnh các tham số biểu hiện cho vật chủ mới và tối ưu hóa codon hơn nữa là những điều kiện tiên quyết để đạt được mục tiêu này (Li và Pfeifer 2014). Mặc dù

đã có nhiều tiến bộ nhưng việc chọn lọc được vật chủ thích hợp là một việc đầy thách thức. Khi loại trừ một trong hai vật chủ, vật chủ mới có thể xây dựng theo quy trình từ dưới lên để tối ưu hóa chức năng của tế bào và các sản phẩm khác loài (heterologous production). Tuy nhiên, công nghệ vi sinh vật trong các con đường chuyển hóa thực vật cũng sẽ phải tạo thuận lợi cho việc khám phá các gen tổng hợp sinh học và chỉ ra các xu hướng tổng hợp chuyển hóa thực vật, và do đó nó là một bước thiết yếu để hướng đến việc ứng dụng các tiềm năng của sinh học tổng hợp (Facchini và cộng sự, 2012). Việc lắp ráp các con đường chuyển hóa trong các loại men, trong trường hợp đặc biệt, có thể góp phần khám phá ra các chức năng gen, đặc biệt là khi không thể biểu thị đặc điểm của enzyme trong phòng thí nghiệm (*in vitro*), để tối ưu hóa hiệu quả của con đường chuyển hóa, và cũng được xem như là nền tảng sinh hóa tổ hợp để tạo ra các phân tử mới trong các loại thực vật.

Sự quan tâm đối với kỹ thuật chuyển hóa thực vật đang ngày càng tăng khi mà các loài thực vật được cho là kho chứa khổng lồ các tinh chất có hoạt tính sinh học tự nhiên rất quan trọng cho ngành sản xuất dược phẩm và công nghệ sinh học (Xu và cộng sự, 2013). Các sản phẩm này hiện nay chủ yếu được chiết xuất từ các nguồn thực vật địa phương hoặc bán tổng hợp từ các sản phẩm trung gian đã phân chiết. Hiệu suất của cả hai quy trình này thấp và quy trình tinh chế sản phẩm đầu ra cuối cùng phức tạp. Quá trình tổng hợp có thể cần phải dùng đến chất xúc tác độc hại hoặc cần phải có các điều kiện phản ứng đặc biệt. Kỹ thuật cải biến con đường chuyển hóa vi sinh vật là một phương pháp có thể khắc phục được những giới hạn này, và mang đến tiềm năng ứng dụng các vi sinh vật có khả năng biến đổi gen. Khi ngày càng nhiều bộ phận trong hệ gen và các thiết bị đã được mô tả rõ đặc điểm (thí dụ các thư viện lưu trữ chất hoạt hóa tổng hợp hoặc các nơi thực hiện liên kết ribosome tổng hợp luôn sẵn có) và chi phí tổng hợp ADN ngày càng giảm, có thể dễ dàng thiết kế và tạo ra các nhà máy tế bào thiết kế riêng biệt có năng suất cao, có khả năng chế tạo ra các sản phẩm và nhiên liệu tự nhiên.

Do đó không có gì đáng ngạc nhiên khi một trong những ứng dụng tiềm năng lớn của sinh học tổng hợp sử dụng các nguồn thực vật là quá trình tái thiết con đường chuyển hóa tổng hợp sinh học thực vật trong các vật chủ khác loài (Li và Pfeifer 2014). Giống như các codon có thể được tối ưu hóa hoặc loại bỏ được các chuỗi trình tự không cần thiết. Cách tiếp cận này cho thấy một trong những ưu điểm quan trọng nhất của sinh học tổng hợp so với kỹ thuật trao đổi chất “đơn giản” đó là có thể sản xuất với năng suất cao. Việc lựa chọn một trong hai con đường chuyển hóa sẵn có mà đã được tối ưu hóa cũng sẽ có khả năng thiết kế được một con đường chuyển hóa nào đó từ chức năng của các gen/enzym đã biết. Mục tiêu chính là có thể cung cấp được các mô hình tiếp cận nhanh chóng và thiết thực cho đến các hợp chất mong muốn. Trong bối cảnh này, sinh học tổng hợp đóng vai trò cốt yếu trong việc cải thiện quá trình biểu hiện gen và tăng năng suất.

Men (*Saccharomyces cerevisiae*) là vi sinh vật sẽ được chọn lựa để có thể tái cấu trúc các con đường chuyển hóa thực vật phức tạp. Lý do lựa chọn loại men này là do nó có các mô hình chuyển hóa ở cấp bộ gen và các nguồn gen luôn sẵn có, và quan trọng hơn đó là việc tối ưu hóa biểu hiện và hoạt tính của các enzym thực vật cần đòi hỏi có các tế bào sinh vật nhân chuẩn. Các vật chủ vi sinh vật có thể điều chỉnh để tạo ra đầy đủ các cấp độ của các tiền chất trao đổi chất và là điểm khởi đầu để từng bước cho ra đời các gen thực vật để sản xuất các sản phẩm trung gian trong phạm vi con đường chuyển hóa mục tiêu đến việc tạo ra các con đường chuyển hóa mới. Các thách thức bao gồm việc tìm ra lựa chọn các yếu tố điều tiết tối ưu để tối ưu hóa con đường chuyển hóa liên tục cũng như khắc phục những hạn chế do hành vi động học của các hệ thống sinh học phức tạp. Mặc dù có những thách thức như vậy, cả vi khuẩn *Escherichia coli* và *Saccharomyces cerevisiae* đều đã được ứng dụng thành công trong sản xuất axit béo, terpenoid, flavonoid, polyketides và alkaloids.

Ngoài vi khuẩn *Saccharomyces cerevisiae* và *Escherichia coli*, *Candida utilis*, *Streptomyces avermitilis* và *Bacillus subtilis* còn được sử dụng như những vật chủ di hợp để sản xuất các sản phẩm đồng vị phóng xạ có nguồn gốc thực vật, như lycopene từ cà chua, artemisin chống sốt rét từ *Artemisia annua* và paclitaxel (taxadiene) với các đặc tính chống ung thư từ *Taxus brevifolia*. Một ví dụ khác là sản xuất isoprenoids ở *Escherichia coli*.

Các ứng dụng tiên tiến của vi sinh vật trong lĩnh vực nhiên liệu sinh học

Chất trao đổi của nấm men được biến đổi thành hydrocacbon đặc biệt hoặc tạo ra phân tử nhắm đích là chất farnesene. Nấm men sử dụng đường như chất dinh dưỡng và là nguyên liệu cho nhà máy tế bào (Amyris 2014). Nó có thể được thiết kế theo cách biến đổi trực tiếp đường thành sản phẩm isobutan sinh học đích cuối cùng và là xăng octane cao (PCSBI 2010, Bioenergies 2014).

LS9 đã phát triển một công nghệ nền sử dụng hiệu quả tự nhiên của sự tổng hợp axit béo của vi sinh vật để tạo ra nhiều loại nhiên liệu và hóa chất. Các vi sinh vật được biến đổi bằng sinh học tổng hợp cho phép thực hiện chuyển đổi chỉ cần một bước carbohydrate tái tạo (đường) thành diesel hoặc este methyl axit béo và một alkane (BIO 2013). Để đạt được điều này, các gen tổng hợp sinh học của alkane được biến đổi thành *Escherichia coli*.

Cách tiếp cận khác để ứng dụng sinh học tổng hợp là sản xuất các nền tảng công nghệ xử lý sinh học thống nhất để tiếp tục ứng dụng trong sản xuất nhiên liệu sinh học. Quá trình này hoạt động thông qua các vi sinh vật đã được thiết kế để tạo ra các đặc tính mà có thể cho phép chúng phân hủy thực vật, sinh khối và chuyển đổi nó thành hydrocarbons có các đặc tính của nhiên liệu sinh học tiên tiến. Các yêu cầu đối với một

sinh vật như vậy là đa dạng con đường chuyển hóa để sản xuất hydrocarbon và khả năng tạo ra enzyme đủ để thủy phân cellulose và hemicellulose hiệu quả. Một ví dụ trong lĩnh vực nghiên cứu này là việc sản xuất nhiên liệu sinh học từ cỏ kê Mỹ (*Panicum viragatum* L.) sử dụng *Escherichia coli*, mà không cần thêm enzyme. Một ví dụ khác là cyanobacteria để chuyển carbon dioxide, nước chưa xử lý và ánh sáng mặt trời thành hydrocarbon lỏng có chức năng tương đương dầu diesel và ethanol (sáng chế số 7.981.647 và 7.968.321 của Mỹ).

3.3.2. Đánh giá các ứng dụng hiện nay trong các hệ thống mô phỏng thực vật và thực vật bậc cao

Nhiều nỗ lực tập trung vào việc thao tác đặc điểm sinh lý và con đường chuyển hóa của các loài tảo và thực vật bậc cao để sản xuất ra các sản phẩm và hợp chất mong muốn, trong đó hiện các nhiên liệu sinh học (bioethanol, biodiesel và H₂) và dược phẩm đang thu hút sự quan tâm lớn nhất. Trong bối cảnh này, các cách tiếp cận sinh học tổng hợp cũng cho phép tạo ra các hợp chất với các tính chất hóa học mới. Không chỉ Prokaryotic (cyanobacteria) mà tảo eukaryote cũng có thể là một sinh vật mục tiêu để sản xuất nhiên liệu sinh học tiên tiến (ví dụ butanol thông qua quang hợp); chúng có nhiều lợi thế có thể sử dụng trong phản ứng sinh học (quang) (không cần đất canh tác) và có thể được lập trình để không cần nước ngọt. Ngoài nhiên liệu sinh học, tảo cũng có thể được sử dụng để sản xuất các sản phẩm liên quan đến dược phẩm như axit béo omega-3, ví dụ: DHA (docosahexaenoic acid) và EPA (axit eicosapentaenoic), ARA (axit arachidonic, axit béo omega-6), chất diệp lục, carotenoid, phycocyanin, allophycocyanin, phycoerythrin,....

Dùng tảo để tạo ra các hợp chất mong muốn

Do việc thao tác gen phân tử của tảo eukaryotic và/hoặc tảo lam prokaryotic dễ hơn so với các loài thực vật bậc cao nên lĩnh vực này đang phát triển nhanh hơn. Các ứng dụng tiềm năng bao gồm sản xuất nhiên liệu sinh học, cuối cùng là chuyển đổi trực tiếp ánh sáng mặt trời thành nhiên liệu. Nó cũng có thể được sử dụng để thay thế việc sản xuất sinh khối trên đất canh tác và thay vì sử dụng nước ngọt, có thể dùng biển, nước ngầm, thậm chí là nước thải. Nhiên liệu sinh học và các sản phẩm phụ có thể được tổng hợp từ nhiều loại tảo khác nhau.

Việc sử dụng tảo và vi tảo để sản xuất nhiên liệu sinh học là một ứng dụng hấp dẫn do chúng có khả năng tích lũy lượng lipid cao và do hàm lượng tinh bột cao nên là một nguồn dự phòng tốt cho quá trình sản xuất ethanol sinh học. Thêm vào đó, chúng có thể được nuôi cấy với chế độ dinh dưỡng rẻ tiền, có tốc độ tăng trưởng nhanh hơn so với thực vật trên cạn và có khả năng tạo sinh khối cao. Vì chúng có thể thay thế cho các loại cây trồng nhiên liệu sinh học hiện nay, ví dụ như đậu tương, ngô, hạt cải dầu và các nguyên liệu lignocellulosic, nên chúng cũng có thể thích ứng được các môi trường kém

thuận lợi hơn (đất không phù hợp cho nông nghiệp, nước biển và nước lợ ven biển), thêm vào đó nó có thể là biện pháp xử lý chất thải dự phòng.

Vi tảo có thể phát triển bằng phương pháp tự dưỡng (quang hợp trong điều kiện ánh sáng thích hợp), dị dưỡng (không có ánh sáng, đòi hỏi nguồn carbon hữu cơ), và hỗn hợp (sự kết hợp của quang hợp và nguồn carbon bên ngoài). Sau cùng, nó có khả năng thích ứng với loài vi khuẩn. Vi tảo được thu hoạch bằng phương pháp ly tâm, kết bông, rửa trôi, hoặc lọc.

Các kỹ thuật nuôi trồng tảo và vi tảo bao gồm các hệ thống ao hồ lộ thiên có thể là tự nhiên như hồ, đầm phá, ao hoặc nước thải, ao nhân tạo, hoặc các thùng chứa và kết. Ao lộ thiên là cách phổ biến nhất và rẻ nhất để sản xuất sinh khối quy mô lớn và đặc biệt dùng để nuôi dưỡng các giống có hàm lượng dầu cao.

Tuy nhiên, các hệ thống lộ thiên cũng đòi hỏi cần có hệ thống kiểm soát chặt chẽ để tránh ô nhiễm, bốc hơi nước, chất gây ô nhiễm, vi khuẩn xâm nhập và nguy cơ phát triển các loài tảo khác. Kích thích tăng trưởng là cần thiết, ít nhất là khi gần cuối giai đoạn tăng trưởng do tỷ lệ bề mặt và khối lượng tiềm ẩn thấp và sự khuếch tán CO₂ vào khí quyển. Ngoài ra, các bể phản ứng sinh học-quang học khép kín sẽ tạo ra một môi trường được kiểm soát có thể tạo ra mật độ tế bào cao hơn và cho phép sản xuất các dược phẩm, dinh dưỡng và mỹ phẩm tinh khiết. Nhược điểm chính của hệ thống khép kín là chi phí cao (xây dựng, khử trùng) và khu vực chiếu sáng nhỏ. Có thể lựa chọn phương pháp nuôi cấy lai để cân bằng những lợi thế và khó khăn trong cả hai hệ thống này.

Tảo là một trong những nguồn nhiên liệu sinh học bền vững đầy tiềm năng trong lĩnh vực năng lượng tái tạo trong tương lai. Một số lĩnh vực nghiên cứu để sản xuất nhiên liệu sinh học dựa trên tảo và vi tảo, đã được chính thức phân loại là thực vật bậc thấp hơn và vi khuẩn cyanobacteria, đây là loài vi khuẩn có khả năng quang hợp oxy. Lipid, chẳng hạn như triacylglyceride (TAG), và carbohydrate, được chiết xuất từ tảo, có thể được sử dụng làm nguồn để chế biến thành dầu diesel sinh học và ethanol. Tảo thường được biến đổi gen để có thể cho phép thích ứng với quá trình sản xuất nhiên liệu sinh học nông nghiệp và công nghiệp. Do đó công cụ sinh học tổng hợp cũng bao gồm trong sản xuất lipid và tảo sinh khối và tiếp tục các chiến lược tối ưu hóa cho các công cụ này. Thách thức là làm thế nào phát hiện ra chủng tảo lý tưởng cho việc sản xuất có hiệu quả năng lượng sinh học và hoạt động quang hợp và thích nghi với sự thay đổi nhiệt độ, ánh sáng, độ mặn và mầm bệnh trong hệ thống nông nghiệp.

Các loại tảo biển lớp Chlorophyceae, Eustigmatophyceae (f.i *Nannochloropsis* sp.) và Haptophyceae được sử dụng để sản xuất nhiên liệu sinh học và các hóa chất hữu cơ công nghiệp khác nhưng nhiều loại tảo và các vi khuẩn cyanobacteria hoạt tính quang

hợp khác được dùng trong thử nghiệm tìm kiếm những ứng cử viên nhiên liệu sinh học tiếp theo.

Sản xuất nhiên liệu sinh học từ sinh khối

Các nỗ lực để nâng cao hiệu quả chuyển đổi năng lượng và sản xuất nhiên liệu sinh học từ chất thải nông nghiệp phi lương thực sử dụng các kỹ thuật sinh học tổng hợp các loại nguyên liệu như thân cây ngô, rơm, củ cỏ, cỏ dại, gỗ dăm và các loại cây sinh khối chuyên dụng như mía, ngô, ngũ cốc và cỏ dại. Mục tiêu là sản xuất nhiên liệu và các sản phẩm hóa học có giá trị khác từ các vật liệu ban đầu đơn giản, rẻ tiền và có khả năng tái tạo một cách bền vững. Nhiều phương pháp sinh học tổng hợp dùng thay thế các phương pháp sản xuất nhiên liệu sinh học hiện nay bao gồm sản xuất xenluloza ethanol (có nguồn gốc từ vỏ tế bào chứ không phải là ngô) và sản xuất các loại rượu có nguồn gốc sinh học. Các loại rượu nguồn gốc sinh học có tiềm năng rất lớn, được làm bằng sinh học tổng hợp và được dùng để sản xuất butanol. Giống như ethanol, butanol được sản xuất bằng quá trình lên men đường và tinh bột hoặc nhờ quá trình phân hủy cellulose. Các công ty và tổ chức, như Agrivida, Amyris, JBEI, British Petroleum, DuPont, Gevo, Global Bioenergies, LS 9, Inc., đã thử nghiệm và ứng dụng thành công phương pháp sinh học tổng hợp để sản xuất nhiên liệu sinh học.

Hiệu quả trong sản xuất năng lượng sinh học có thể tăng lên khi điều chỉnh các thành tế bào thực vật để tăng khả năng tiêu sinh khối lignocellulosic. Agrivida đã tạo ra được công nghệ kỹ thuật phân tử INzyme™ độc quyền. Các enzyme biến đổi có thể cho phép chuyển đổi hiệu quả đáng kể thành tế bào thực vật thành đường thông qua quá trình tạo ra các enzym ngũ đồng, sau đó các enzym này sẽ được kích thích phát triển khi vào mùa thu hoạch lúa mì, ngô....

Các enzym đã được biến đổi này có thể tăng phạm vi sinh khối rộng hơn và hiệu quả hơn, do đó có thể tận dụng các chất thải nông nghiệp như thân cây và rơm, và gỗ để sinh khối. Một số nhiên liệu sinh học hiện có sẵn dưới dạng có sản phẩm (ngắn hạn), phát triển thí điểm (trung hạn) và được kỳ vọng trong tương lai, khi các công ty đã xác định được mục tiêu phát triển các ứng dụng trong lĩnh vực này.

“Cây phát sáng” (Glowing plants)

Một nghiên cứu sâu hơn cho ứng dụng các công nghệ kỹ thuật sinh học tổng hợp được thấy rõ trong thiết kế/ công nghệ tạo ra cây phát sáng. Trong dự án có tên là "Thực vật phát sáng", các kỹ thuật sinh học tổng hợp và phần mềm của Genome Compiler dùng cho việc thiết kế và "in" ADN, được sử dụng cho các quá trình chuyển đổi của vi khuẩn *Arabidopsis thaliana*. Các quá trình này sẽ dẫn tới quá trình sản xuất luciferase và luciferin, chúng phát ra ánh sáng yếu, màu xanh lá cây khi có các mạch di truyền từ đom đóm. Cuối cùng quá trình tạo ra cây này được đặt tên là "Thực vật phát sáng". Pollack

(2013) cũng tăng ý tưởng này thêm một giai đoạn nữa đó là phát triển của các loài cây phát sáng này để có thể thay thế đèn chiếu sáng trên đường và những loài hoa trồng trong chậu thì sẽ có khả năng phát sáng đủ để có thể đọc sách.

Tuy nhiên, những lo ngại về sự phát tán không được giám sát và kiểm soát các sinh vật / thực vật sinh học tổng hợp như vậy chưa có hệ thống quy định nào can thiệp vào trường hợp này.

3.3.3. Các ứng dụng đang xuất hiện

Sinh học tổng hợp không chứa tế bào để thay thế nuôi cấy tế bào thực vật

Nuôi cấy tế bào thực vật cho phép tạo ra được các chất chuyển hóa thứ cấp bền vững nhưng điều này tạo ra thách thức bởi sản lượng thấp. Sự biến đổi trong nuôi cấy tế bào là một trong những yếu tố quan trọng điều chỉnh chuyển hóa và quá trình tạo ra protein. Nói cách khác, sinh học tế bào tự do là một tiềm năng để sản xuất ra các hợp chất mong muốn và để kết hợp chặt chẽ các axit amin phi tự nhiên đã được mã hóa mà không bị giới hạn và không cần thiết phải có các tế bào sống nguyên vẹn. Các ứng dụng gần đây của lĩnh vực sinh học tổng hợp không chứa tế bào bao gồm sản xuất kháng thể (trong các hệ thống có nền tảng là prokaryote và eukaryote), dược phẩm (ví dụ như vắc-xin chống lại bệnh lymphoma và sốt rét) hoặc các chất xúc tác sinh học như hydrogenase và lipase. Cuối cùng, việc kết hợp các axit amin phi tự nhiên sẽ mang đến một số ứng dụng chẳng hạn như tạo ra sự tương tác ligand-protein, các liệu pháp điều trị bằng sinh học và phân tích sinh học.

Những biểu hiện tạm thời của sinh học tổng hợp trong các loài thực vật

Các hệ thống biểu hiện tạm thời và sự biến đổi được kiểm soát của chúng là những công cụ quan trọng trong sinh học tổng hợp thực vật. Sự biến đổi tạm thời của các mô thực vật là rất nhanh và việc sản xuất các protein tái tổ hợp hoặc các sản phẩm có hoạt tính của chúng rất bền, và sản lượng tạo ra có thể cho phép tiến tới sản xuất thương mại. Các mục tiêu hấp dẫn là việc tạo ra các triterpenes (tiền chất steroid trong cả thực vật và động vật) có nhiều phạm vi ứng dụng thương mại tiềm năng (dược phẩm, thực phẩm và công nghiệp hóa mỹ phẩm,...) nhưng khó thực hiện với sinh học tổng hợp và có ít trong thực vật. Một ví dụ khác là sản xuất các chất trung gian trong quá trình sinh tổng hợp thuốc chống sốt rét artemisinin. Mới đây, con đường chuyển hóa đã có bước tiến lớn. Cụ thể là việc sản xuất các hợp chất thơm dhurrin phụ thuộc vào ánh sáng trong các lục lạp (chloroplast) được xem là ví dụ điển hình của khai thác quang hợp trong sinh học tổng hợp.

Nhiễm sắc thể siêu nhỏ được thiết kế trong các loài thực vật

Giống như ở nấm men và động vật có vú, nhiễm sắc thể nhân tạo có thể tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp tiếp cận từ dưới lên hoặc từ trên xuống để được đưa vào

các loài thực vật. Các ứng dụng trong tương lai được đề xuất bao gồm thiết kế các nhiễm sắc thể theo các đặc điểm mong muốn và thiết kế chúng theo cách có thể chuyển từ thể hệ này sang các thể hệ kế tiếp, đảm bảo chuyển giao hiệu quả đến hầu hết các thể hệ con.

Bằng cách chuyển các nhiễm sắc thể mini từ chất gây cảm ứng haploid tới các dòng mục tiêu, rào cản liên kết có thể được loại bỏ. Các nhiễm sắc thể mini có thể được đưa vào một số loài khác nhau, mang nhiều tính chất có lợi như toàn bộ con đường sinh hóa dẫn đến sự thích nghi và cải tiến của cây trồng thực địa (ví dụ kháng sâu bệnh, phẩm chất dinh dưỡng, năng suất ...).

Ngoài *Arabidopsis* ra, kỹ thuật đưa thành công nhiễm sắc thể mini vào các loài thực vật trọng điểm như ngô, trong đó nhiễm sắc thể dư thừa hay nhiễm sắc thể B là mục tiêu chính do sự biến đổi của chúng làm thay đổi kiểu hình. Các nghiên cứu trong tương lai sẽ tập trung vào việc sửa đổi các nhiễm sắc thể trong cơ thể và tránh các vấn đề tiềm tàng trong quá trình giảm phân.

“Lá cây nhân tạo” - dùng năng lượng mặt trời như năng lượng sinh học để sản xuất nhiên liệu mặt trời

Một nhánh của sinh học tổng hợp là phương pháp quang hợp nhân tạo, hay tạo ra các thực vật hấp thụ hiệu quả hơn năng lượng mặt trời và trực tiếp chuyển đổi nó thành nhiên liệu. Trong phạm vi này, thiết kế “lá cây” nhân tạo đã được đề xuất, với khái niệm chính là sử dụng ánh sáng mặt trời để tạo ra hydro và các nhiên liệu khác có hiệu quả hơn nhiều so với tạo sinh khối từ lá cây thật. Các nhà nghiên cứu ở Anh hiện tập trung chính vào việc chuyển đổi trực tiếp ánh sáng mặt trời thành “nhiên liệu mặt trời” bằng cách nỗ lực sử dụng các phản ứng hóa học tương tự như quang hợp nhưng trong một hệ thống nhân tạo và sản xuất những loại nhiên liệu lỏng gốc carbon thông qua các công cụ sinh học tổng hợp.

Trung tâm quang hợp nhân tạo California đã tập trung vào việc thiết kế lá cây nhân tạo nhờ vào cấu trúc của hai điện cực được nhúng hoàn toàn trong dung dịch lỏng. Mỗi điện cực gồm một vật liệu bán dẫn được lựa chọn kỹ lưỡng để thu năng lượng ánh sáng từ một phần cụ thể trong vùng quang phổ mặt trời. Quá trình này sử dụng các photon từ ánh sáng mặt trời để phân tách các phân tử nước thành oxy và hydro để có thể sử dụng làm nhiên liệu. Ngoài ra còn có những nghiên cứu tương tự về việc ứng dụng năng lượng mặt trời để sản xuất các nhiên liệu thay thế, bao gồm những phát triển ứng dụng trong lĩnh vực nhiên liệu năng lượng mặt trời, HyperSolar photoabsorbers hoặc quá trình hóa học quang hợp nhân tạo.

Khái niệm về quang hợp nhân tạo giống nhau trong mọi cách phương pháp tiếp cận, đó là: sử dụng nguồn năng lượng lớn nhất là mặt trời, kết hợp tích trữ năng lượng trong

nhiên liệu hóa học. Thách thức ở đây chính là việc tối ưu hóa tất cả các bước sản xuất ở giữa và sử dụng ánh sáng một cách hiệu quả nhất.

IV. ĐÁNH GIÁ RỦI RO VÀ QUẢN LÝ RỦI RO

4.1. Các phương pháp đánh giá rủi ro hiện tại

Các phương pháp tiếp cận hiện tại đối với việc đánh giá rủi ro cây biến đổi gen ở Liên minh châu Âu (EU) được xác định bằng các văn bản hướng dẫn của EU và hướng dẫn của Cơ quan An toàn Thực phẩm châu Âu (EFSA) và đối phó với việc tiếp thị thực phẩm và thức ăn nuôi, sử dụng cho các mục đích ngoài lương thực và thức ăn chăn nuôi, và phóng thích vào môi trường (EFSA 2011, 2010a, 2009, EC 2001, 2003, 2013). Đánh giá rủi ro được đặc trưng bởi bốn bước khác nhau: xác định nguy cơ, mô tả đặc tính nguy cơ, đánh giá phơi nhiễm và mô tả đặc tính rủi ro.

Ngoài ra, các yếu tố sau là một phần của thủ tục đánh giá rủi ro hiện tại:

I) Đánh giá rủi ro cây biến đổi gen (GM) và thực phẩm và thức ăn chăn nuôi (EFSA 2011):

- Đặc điểm sinh vật hiển và cây nhận
- Thay đổi gen và các hậu quả về chức năng của chúng
- Các đặc điểm nông học và kiểu hình của cây GM
- Đặc điểm về thành phần của cây GM và thức ăn và thức ăn có nguồn gốc
- Độc tính tiềm ẩn và dị ứng của sản phẩm gen (protein, chất chuyển hóa) và toàn bộ cây GM và các sản phẩm có nguồn gốc từ đó.
- Chế độ ăn uống và tiềm năng tác động dinh dưỡng
- Ảnh hưởng của quá trình chế biến và lưu trữ lên các đặc tính của sản phẩm từ cây GM.

ii) Đánh giá rủi ro môi trường của cây GM (EFSA 2010a):

- Sự tồn tại và xâm lấn bao gồm dòng di chuyển gen từ cây sang cây
- Chuyển gen thực vật sang vi sinh vật
- Tương tác của cây GM với các sinh vật mục tiêu
- Tương tác của cây GM với các sinh vật không phải là mục tiêu
- Tác động của kỹ thuật canh tác, quản lý và thu hoạch cụ thể
- Ảnh hưởng đối với các quá trình sinh địa hóa học
- Ảnh hưởng đối với sức khỏe con người và động vật
- Giám sát môi trường sau khi bán trên thị trường

Đánh giá rủi ro của thực vật biến đổi gen không dùng làm thực phẩm hay thức ăn chăn nuôi có các yếu tố tương tự như những đặc điểm trên (EFSA 2009): đặc tính phân tử, sự an toàn cho người và động vật (ví dụ như tính chất cấu thành, độc tính), sự an toàn cho môi trường, giám sát.

Với cả ba tài liệu hướng dẫn của EFSA, cách tiếp cận so sánh được coi là một phần quan trọng trong đánh giá rủi ro. Bên cạnh đặc tính phân tử, nó tạo cơ sở cho việc đánh giá các thay đổi dự định của kiểu hình cây trồng, đặc biệt là để phát hiện bất kỳ tác động không mong muốn nào:

- "Các tác động ngoài ý muốn có thể được phát hiện thông qua việc so sánh các đặc tính nông học, kiểu hình và đặc điểm thành phần tổng hợp" (EFSA 2011).
- "Đánh giá an toàn so sánh được thực hiện tiếp theo để xác định những khác biệt gây ra bởi các tác động dự kiến hay ngoài dự kiến" (EFSA 2010a).
- "Các phân tích thành phần phải được thực hiện [...] để xác định và định lượng những thay đổi không mong muốn có thể có trong thành phần của cây GM" (EFSA 2009).

Các phương pháp so sánh được áp dụng như là thành phần chính trong đánh giá rủi ro sinh vật biến đổi gen (GMO) (OECD 1993). Chúng dự kiến cung cấp thông tin quan trọng về sự tương đương đáng kể giữa cây biến đổi gen và những cây so sánh, trong trường hợp cây trồng lan truyền sinh sản, được xác định là các kiểu gen không GM có nguồn gốc di truyền gần nhất có thể với cây GM (EFSA 2011). Hướng dẫn EFSA cho cây chuyển gen sử dụng cho các mục đích không làm lương thực và thức ăn chăn nuôi đưa ra những nhận xét chi tiết về các cây biến đổi gen "biến đổi" đáng kể, nói rằng các cây biến đổi gen đáng kể không thể so sánh thống kê so với thực vật thông thường làm cho việc đánh giá rủi ro trở nên phức tạp và tốn công sức hơn. Lý do là những thay đổi di truyền sâu rộng (ví dụ như việc chèn nhiều gen) có thể dẫn đến sự thay đổi đáng kể trong quá trình chuyển hóa và thành phần của cây GM (EFSA 2009).

Đối với cây GM không sử dụng cho mục đích lương thực và thức ăn chăn nuôi, Ủy ban GMO của EFSA vẫn cho rằng đại đa số sinh học cơ bản của cây GM và cây so sánh không GM sẽ vẫn như cũ. Do đó một mức so sánh nhất định với một cây đối chiếu không GM sẽ luôn luôn phù hợp.

4.2. Khả năng áp dụng các phương pháp hiện tại lên cây trồng được tạo ra bằng bộ gen tổng hợp

Theo định nghĩa, sự trao đổi chất và cũng là sinh lý học của một sinh vật tổng hợp sẽ rất khác với bất kỳ cây thông thường nào. Ngoài ra, các cây trồng được tạo ra bởi bộ gen tổng hợp khác nhau tùy theo thành phần, và mọi quá trình kỹ thuật tổng hợp của cây

trồng có thể dẫn đến các quy trình sinh lý và sinh học chưa được biết đến. Vì lý do này, việc áp dụng khái niệm về sự tương đương đáng kể là không thể và không khả thi.

Việc đánh giá rủi ro và đánh giá các cây trồng tổng hợp phải được thực hiện theo từng trường hợp cụ thể và hướng vào tác động tiềm tàng đối với sức khỏe con người và môi trường:

- Mức độ chênh lệch về đặc điểm sinh học chính của cây trồng thông thường nói chung,
- Công nghệ và khái niệm cho thiết kế cây trồng tổng hợp,
- Các nguyên lý sinh học và quá trình xây dựng vật liệu tổng hợp và các chức năng và đặc điểm sinh học cơ bản của sinh vật tổng hợp ở hệ gen và cấp độ trao đổi chất,
- Chức năng và hành vi dự kiến của một nhà máy tổng hợp,
- Thiết kế các thử nghiệm thực địa cần tính đến các tình huống mà môi trường tiếp nhận của nhà máy tổng hợp khác biệt đáng kể so với môi trường so sánh thích hợp,
- Các môi trường khác nhau liên quan đến các chức năng và mục đích sử dụng dự định của cây trồng tổng hợp,
- Các đặc tính sinh học và di truyền cụ thể, ví dụ: Sự biểu hiện của các protein nhân tạo, các cơ chế kiểm soát mới,
- Lựa chọn các cây tổng hợp (endpoint) cần phải kiểm tra, có thể dựa trên các nghiên cứu mới về cây trồng (DUS), mà có thể cung cấp cơ sở cho việc thiết lập một yêu cầu tối thiểu cho cây trồng được tạo ra bởi bộ gen tổng hợp (UPOV 2011)
- Biến thể của các cây tổng hợp kiểm tra phụ thuộc vào sinh học của sinh vật tổng hợp,
- Đánh giá dữ liệu so sánh liên quan đến kết quả phân tích đặc tính phân tử,
- Xác minh mọi tác động không lường trước bằng các dữ liệu thử nghiệm bổ sung (ví dụ: kiểm tra thực địa, nghiên cứu an toàn thực phẩm)
- Vấn đề do các sản phẩm của các cây trồng tổng hợp (ví dụ như một axit nucleic khác) đưa vào môi trường có thể rất nguy hiểm, và
- Cần thiết phải kiểm tra trong phòng thí nghiệm rộng rãi trước mọi thử nghiệm phóng thích vào môi trường.

Đáng chú ý là các gen tổng hợp, và nói chung những dạng sống mới không có lịch sử tiến hóa và không thể tìm truy ngược từ các tổ tiên hoang dã (Norton 2010). Cách tiếp cận so sánh thường không thể áp dụng được do thiếu lịch sử tiến hoá và mối quan hệ của cây trồng tổng hợp cấp cao hơn (hệ thống sinh học không tồn tại) và một cây trồng thông thường. Việc đánh giá rủi ro độc tính và dị ứng toàn diện có thể cung cấp những dữ liệu bị thiếu. Các phương pháp tiếp cận được chấp nhận trên phạm vi quốc tế áp dụng cho

việc thử nghiệm hóa chất trong thực phẩm tạo cơ sở cho việc kiểm tra và định lượng các tác dụng bất lợi do các phân tử nhân tạo (ADN, protein, chất chuyển hóa ...). Tác dụng dài hạn sẽ được kiểm tra bằng các nghiên cứu theo liều lượng lặp lại thích hợp.

Nghiên cứu cấp thức ăn cho loài gặm nhấm trong 90 ngày được thừa nhận rộng rãi như là một xét nghiệm thích hợp nhất để phát hiện ra một loạt các điểm độc tính khi tiến hành một cách thích hợp (EFSA 2008). Trong trường hợp cây tổng hợp, việc nghiên cứu độc tính lâu dài có thể mô tả mối tương quan giữa liều lượng và phản ứng, dự đoán tác động của độc tính ở mức độ phơi nhiễm của con người, và các giả thuyết kiểm tra về phương thức hoạt động của cây tổng hợp và vật liệu có nguồn gốc từ đó. Các nghiên cứu độc tính lâu dài ở động vật có thể xác định một cách chắc chắn các mức độ tác dụng bất lợi (NOAEL) không quan sát thấy dùng cho việc thiết lập tiêu chuẩn an toàn đối với việc tiếp xúc lâu dài của con người (OECD 2009). Các dữ liệu về độc tính bổ sung có thể cung cấp thông tin để nghiên cứu tiềm năng của vật liệu gen nhân tạo hoặc các protein mới xuất hiện từ các cây tổng hợp để gây ra các rối loạn phát triển, sinh sản, hormone, thần kinh hay gây ung thư ở người, và độc tính của vật liệu hữu cơ tổng hợp.

4.3. Đánh giá hậu quả thực tế và rủi ro của việc phóng thích vào môi trường thực vật được tạo ra bằng bộ gen tổng hợp

Từ những dữ liệu hiện có, khả năng việc phóng thích thử nghiệm các cây trồng tổng hợp cấp cao đúng nghĩa trong tương lai gần và trung hạn là rất khó xảy ra. Khả năng thực tế hơn là các phương pháp sinh học tổng hợp được thực hiện cho sự phát triển của các vi sinh vật quang hợp, vi khuẩn cyano và vi tảo (tảo đơn bào). Các phương pháp tiếp cận khác nhau để thiết kế lại bộ máy quang hợp của vi tảo hoặc lộ trình mới để sản xuất các hợp chất với các tính chất hóa học mới đã được công bố.

Vi tảo biến đổi bằng kỹ thuật gen hiện đang được sử dụng cho các quy trình công nghiệp khác nhau, trong đó nổi bật nhất là sản xuất nhiên liệu sinh học. Các chiến lược đánh giá rủi ro quan trọng nhất cho các kịch bản phóng thích này đã được mô tả, cung cấp các khía cạnh cơ bản cần thiết về vi tảo được tạo ra bằng các công nghệ mới, bao gồm sinh học tổng hợp.

Vi tảo có thể được nuôi cấy trong các hệ thống thủy văn khác nhau, từ hồ ao ngoài trời đến các bể phản ứng sinh học kín với môi trường kiểm soát chặt chẽ. Các nguy cơ tiềm ẩn có thể được xác định liên quan đến sự khuếch đại quần thể vi khuẩn, vi tảo (bao gồm các sinh vật tổng hợp), chất độc và các enzyme trong các hệ thống nuôi trồng đó có thể gây nguy hiểm cho môi trường và cá nhân. Mỗi quá trình có thể tạo ra các hợp chất có khả năng gây bệnh, độc, gây nhiễm hoặc dị ứng. Do đó, mọi tác động của kịch bản phóng thích có thể được đánh giá rủi ro chỉ bằng sự hiểu biết đầy đủ của quá trình sử dụng và các sinh vật tảo cụ thể được sử dụng. Các đặc điểm kỹ thuật của sinh vật tổng

hợp và hành vi của chúng trong các điều kiện khác nhau cần được hiểu rõ và xác định đặc điểm.

Do đó, các điểm quan trọng nhất liên quan đến đánh giá rủi ro của việc sản xuất các hợp chất công nghiệp bao gồm nhiên liệu sinh học bằng tảo tổng hợp là:

- đệ trình tất cả các dữ liệu có được về (các) vi sinh vật (ví dụ như cách tiếp cận sinh học tổng hợp) và các hoạt động dự kiến,

- một đánh giá trước của phóng thích vào môi trường,

- thông tin và thảo luận liên quan đến những ảnh hưởng thực tế hoặc tiềm ẩn đối với sức khoẻ hoặc môi trường của vi tảo cùng với các đặc tính kiểu hình và sinh thái,

- Sử dụng các dữ liệu thực nghiệm chứng minh không có tính gây bệnh (ví dụ: nghiên cứu độc tính) có tính đến:

- sự hiện diện và mức độ của vật liệu tổng hợp hoặc các thành phần mới khác (DNA/protein tổng hợp, các phân tử phi tự nhiên vv ..)

- sự khác biệt giữa sinh vật tổng hợp và các hệ thống tự nhiên. Ví dụ: Điều chỉnh gen, chức năng trao đổi chất, hóa học, các thành phần tế bào, phản ứng với môi trường khác nhau

- tác động của những thay đổi khác lên các đặc điểm giải phẫu, dinh dưỡng và sinh lý do quá trình thiết kế tổng hợp

- thông tin về các hoạt động thử nghiệm thực địa bao gồm các mục tiêu và ý nghĩa của hoạt động với lý do để phóng thích vào môi trường,

- số lượng và tần suất các vi sinh vật được phóng thích theo đề xuất,

- mô tả đầy đủ vị trí bao gồm các đặc điểm về địa lý, vật lý, hóa học và sinh học, và khoảng cách đến nơi cư trú hoặc sinh hoạt của con người, và

- mô tả về các thủ tục khoanh vùng đề xuất, các thủ tục khẩn cấp và giảm nhẹ tác động tiềm tàng, và các thủ tục chấm dứt hoạt động.

4.4. Những cân nhắc về an toàn sinh học đối với các Khối ghép Sinh học (BioBricks) được sử dụng cho sinh học tổng hợp

Khung cơ sở để đánh giá an toàn sinh học là phân loại của các (vi) sinh vật chủ thành 4 nhóm rủi ro theo như bảng sau (WHO 2004).

Phân loại rủi ro	Định nghĩa	Giải thích
Rủi ro nhóm 1	Không có rủi ro hay ở mức thấp đối với cộng đồng và cá nhân	<i>Một vi sinh vật không gây ra bệnh cho người hoặc động vật.</i>
Rủi ro nhóm 2	Rủi ro cá nhân ở mức vừa phải, rủi ro thấp cho cộng đồng	<i>Mầm bệnh có thể gây bệnh cho người hoặc động vật nhưng không gây nguy hiểm nghiêm trọng cho người làm việc trong phòng thí nghiệm, cộng đồng, vật nuôi hoặc môi trường. Các phơi nhiễm trong phòng thí nghiệm có thể gây nhiễm nghiêm</i>

		<i>trọng, nhưng có các biện pháp điều trị và phòng ngừa có hiệu quả và nguy cơ lây lan bệnh ở mức hạn chế.</i>
Rủi ro nhóm 3	Rủi ro cao cho cá nhân, rủi ro thấp cho cộng đồng	<i>Mầm bệnh thường gây ra bệnh nghiêm trọng cho người hoặc động vật nhưng không lan truyền từ người bệnh sang người khác. Có các biện pháp điều trị và phòng ngừa hiệu quả.</i>
Rủi ro nhóm 4	Rủi ro cao cho cá nhân, và cộng đồng	<i>Mầm bệnh thường gây ra bệnh nghiêm trọng cho người hoặc động vật và có thể lây truyền từ người này sang người khác một cách trực tiếp hoặc gián tiếp. Thường chưa có các biện pháp điều trị và phòng ngừa hiệu quả.</i>

Do bất kỳ kỹ thuật mới nào cũng có thể gây ra nguy cơ rủi ro đối với sức khỏe con người, động vật hoặc môi trường, Sinh học tổng hợp phải tuân thủ các quy định cụ thể để thực hiện nghiên cứu một cách có trách nhiệm và an toàn. Trường hợp này có liên quan đặc biệt đối với các dự án dự định phóng thích vào môi trường hoặc sử dụng cho mục đích thương mại.

Trọng tâm của đánh giá rủi ro các cấu trúc được thiết kế với BioBricks™ thường áp dụng an toàn phòng thí nghiệm an toàn dựa trên hướng dẫn an toàn sinh học của Viện Y tế Quốc gia Hoa Kỳ (NIH) (Chỉ dẫn cho nghiên cứu liên quan đến các phân tử axit nucleic tái tổ hợp hoặc tổng hợp) (NIH 2013) và WHO (Sổ tay an toàn sinh học trong phòng thí nghiệm) (WHO 2004).

Điều quan trọng phải lưu ý là khung phân loại nhóm rủi ro chỉ được sử dụng cho các phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, phân loại này cung cấp cơ sở thuận tiện và khởi điểm cho một đánh giá rủi ro toàn diện của các thiết bị BioBrick™ và cấu trúc của nó.

Việc đặt một tác nhân vào một nhóm rủi ro dựa trên một quy trình đánh giá rủi ro toàn diện xem xét các vấn đề sau (WHO 2004):

- 1) Tác nhân gây bệnh và liệu truyền nhiễm
- 2) Kết quả tiềm ẩn của phơi nhiễm
- 3) Đường lây nhiễm tự nhiên
- 4) Các đường lây nhiễm khác, kết quả từ thao tác phòng thí nghiệm (đường tiêu hóa, không khí, nuốt phải)
- 5) Tính ổn định của tác nhân trong môi trường
- 6) Mật độ của tác nhân và khối lượng của vật liệu được chế tác
- 7) Sự hiện diện của một vật chủ thích hợp (người hoặc động vật)
- 8) Thông tin có được từ các nghiên cứu trên động vật và các báo cáo về các bệnh lây nhiễm trong phòng thí nghiệm hoặc các báo cáo lâm sàng
- 9) Kế hoạch hoạt động phòng thí nghiệm (sonication (nghiền bằng sóng âm), aerosolisation (son khí hóa), ly tâm, ...)

10) Mọi thao tác di truyền nào của sinh vật có thể mở rộng phạm vi tác động hoặc thay đổi độ nhạy của tác nhân đối với các phác đồ điều trị hiệu quả, đã biết.

11) Có sẵn các biện pháp dự phòng hiệu quả hoặc can thiệp điều trị ở địa phương
Việc phân cấp mức độ an toàn sinh học có tính đến các vấn đề sau:

- Tổ chức (khả năng gây bệnh của vật chủ / tác nhân tiềm năng)
- Phương tiện có sẵn
- Trang thiết bị

4.5. Các tác động tiềm tàng của sinh học tổng hợp liên quan đến an toàn sinh học

An toàn sinh học trong bối cảnh sinh học tổng hợp là một vấn đề quan tâm lớn. Sự phóng thích vô tình hoặc cố ý các sinh vật thu được từ các kỹ thuật sinh học tổng hợp (= vi khuẩn tổng hợp) có thể có những tác động tiêu cực đáng kể đối với sức khỏe con người hoặc động vật hoặc môi trường

4.5.1. Tác động đến hệ sinh thái

Phóng thích có chủ ý và không chủ ý

Việc phóng thích có chủ ý và vô tình các sinh vật tổng hợp (bên ngoài việc sử dụng trong các phòng thí nghiệm nghiên cứu và các cơ sở sản xuất) có thể dẫn đến các tác động bất lợi đối với đa dạng sinh học. Do sự thay đổi về sự thích hợp sinh học, các sinh vật tổng hợp có thể trở nên xâm lấn mạnh hơn, cho thấy khả năng tồn tại tăng lên hoặc một hình mẫu sống sót được cải thiện, và do đó có thể làm giảm khả năng sống sót của quần thể sinh vật bản địa trong môi trường sống bị phơi nhiễm. Ngay cả khi tuổi thọ của chúng dự kiến bị giới hạn đáng kể thì vẫn có thể xảy ra những gián đoạn ngắn hạn đáng kể trong đa dạng sinh học (so sánh với sự xâm nhập của tảo nở hoa).

Sinh vật tổng hợp dự định sử dụng trong phạm vi hẹp

Các vi sinh vật tổng hợp ban đầu chỉ có mục đích sử dụng trong phạm vi hẹp có thể vô tình được thoát ra môi trường do đổ, tràn hoặc rò rỉ bể phản ứng sinh học (bioreactor). Thông thường các loại sinh vật này bị cho là chịu thích nghi kém và bất lợi về chọn lọc so với các quần thể hoang dã. Tuy nhiên, các vi khuẩn có đặc điểm là có khả năng thay đổi tiến hoá nhanh chóng và các sinh vật tổng hợp vô hại hoặc yếu có thể nhanh chóng đạt được những đột biến có lợi. Rõ ràng rằng các sinh vật tổng hợp - một khi được phóng thích ra môi trường - không thể thu lại được nữa.

Bước đầu tiên trong việc giảm thiểu các rủi ro tiềm tàng của các sinh vật tổng hợp là đặt ra các rào cản vật lý giúp ngăn ngừa tình cờ phóng thích vào môi trường. Khi việc ngăn chặn vật lý có thể không đủ, thì ngăn chặn sinh học được đề xuất như là một giải

pháp khắc phục các nhược điểm của nó. Để ngăn chặn sinh học, các nghiên cứu sau được đề xuất và theo đuổi:

a) Gây hủy diệt: "công tác tiêu diệt", "gen tự sát". Cách tiếp cận này có xu hướng biến đổi trở lại với kiểu hình mục tiêu bằng cách bất hoạt gen gây chết người. Do tốc độ tiến hóa cao của vi sinh vật nên chiến lược này dự kiến sẽ không đáng tin cậy.

b) Ngăn ngừa chuyển gen ngang. Việc áp dụng các chủng kháng fage hoặc các plasmid thiếu các chuỗi gen chuyển thích hợp được đề xuất. Tuy nhiên, việc ngăn ngừa sự hấp thu ADN tự do bằng biến đổi tự nhiên của các vi sinh vật khỏe mạnh sẽ là thách thức.

b) Ngăn chặn dinh dưỡng. Có thể thiết kế các vi sinh vật tổng hợp dinh dưỡng thụ động chỉ dựa vào chất dinh dưỡng có trong các phòng thí nghiệm (in vitro). Việc vô tình phóng thích vào môi trường sẽ dẫn đến chết tế bào do đói. Cách tiếp cận này có một số hạn chế vì các chất dinh dưỡng cần thiết có thể có trong môi trường hoặc tác nhân đột biến dinh dưỡng thụ động có thể sử dụng chất chuyển hóa từ các sinh vật lân cận hoặc chuyển gen theo chiều ngang có thể bù đắp cho đột biến dinh dưỡng thụ.

d) Ngăn chặn về ngữ nghĩa: Xenobiology (sinh học vũ trụ). Việc áp dụng các nucleotide sửa đổi và/hoặc xương sống thay thế khác với phospho-ribose và deoxyribose sẽ dẫn đến sự không tương thích với polymerase diễn ra tự nhiên, và sự giam hãm sinh vật tổng hợp cách ly khỏi môi trường sống dường như có triển vọng. Tuy nhiên, các nucleotide phi tự nhiên và xương sống thay thế trong các axit nucleic có thể độc hại với các tế bào thông thường.

Sinh vật tổng hợp được dự định phóng thích vào môi trường

Trái với kinh nghiệm thu được từ các vi sinh vật biến đổi gen cho đến nay, được phóng thích ra một cách có chủ ý và thường không hoạt động tốt trong môi trường sống của chúng, các sinh vật tổng hợp dự định đưa vào môi trường được thiết kế đặc biệt để tồn tại trong các điều kiện khắc nghiệt của môi trường. Chúng có thể thể hiện những đặc điểm mang lại lợi thế chọn lọc trong môi trường sống tương ứng, làm giảm khả năng sống sót của quần thể sinh vật bản địa trong hệ sinh thái tiếp xúc. Trong bối cảnh này, cần làm rõ là các chuyên gia đánh giá rủi ro và các nhà quản lý cho đến nay chỉ có ít kinh nghiệm trong việc xem xét các rủi ro tiềm tàng của việc phóng thích sinh vật tổng hợp có chủ định và họ không có kinh nghiệm trong việc xem xét các rủi ro tiềm ẩn phát sinh từ sự tiến hóa của vi sinh vật tổng hợp và tương tác của chúng với sinh vật bản địa trong môi trường sống mới của chúng.

4.5.2. Chuyển đổi vật liệu gen/ADN mới sang sinh vật bản địa

Chuyển vật liệu gen từ sinh vật tổng hợp sang vật chủ tự nhiên có thể được thực hiện bằng dòng gen theo chiều dọc hoặc bằng chuyển gen ngang (HGT).

Chuyển gen theo chiều dọc

Các gen được biến đổi có thể được truyền cho các quần thể bản địa cùng loài hoặc các loài có quan hệ gần nhau thông qua phấn hoa hoặc thông qua việc trao đổi hạt giống không cẩn thận như đã xảy ra với sự phân tán các gen biến đổi gen trong các biến thể ngô không biến đổi gen ở Mexico do hệ thống phân tán hạt giống và thị trường ngũ cốc cầu thả.

Chuyển gen ngang

Chuyển gen ngang giữa các vi sinh vật được truyền gian bằng cách chuyển đổi (hấp thu ADN tự do), liên hợp (chuyển ADN giữa vi khuẩn thông qua tiếp xúc tế bào-tế bào) và sự chuyển tải (chuyển ADN thông qua các con virut). Vấn đề chính trong việc đánh giá rủi ro phát sinh từ chuyển gen theo chiều ngang là vẫn còn thiếu sự hiểu biết toàn diện về tần suất chuyển gen ở môi trường sống tự nhiên và các cơ chế liên quan. Mặc dù người ta biết rằng chuyển gen theo chiều ngang cũng tham gia vào quá trình hình thành sự tiến hóa của bộ gen eukaryote. Liên quan đến việc chuyển đổi việc trao đổi vật liệu di truyền biến đổi cũng có thể xảy ra ngay cả khi vật mang ban đầu đã chết (Wright và cộng sự, 2013).

Tác động đến đa dạng sinh học ở cấp độ di truyền

Việc chuyển gen theo chiều ngang từ sinh vật tổng hợp sang các quần thể bản địa có thể dẫn đến sự thay đổi đa dạng sinh học ở cấp gen. Một ví dụ sinh động cho các tác dụng bất lợi của chuyển gen ngang là sự lan rộng không hạn chế của các gen kháng thuốc kháng sinh trong môi trường lâm sàng và tự nhiên dẫn đến sự "ô nhiễm gen" ở các dòng vi khuẩn bản địa với các yếu tố di truyền trước đây không phổ biến ở các cộng đồng bị phơi nhiễm. Việc phổ biến các yếu tố kháng có ảnh hưởng tiêu cực đến bệnh tật và tử vong của bệnh nhân mắc bệnh truyền nhiễm và gây gánh nặng tài chính nghiêm trọng cho sức khỏe cộng đồng. Chưa có sự đồng thuận về việc liệu bản thân chuyển gen có là một tác dụng có hại cần được ngăn ngừa hay chỉ là một cơ chế tiềm năng mà có thể gây ra các tác động bất lợi (hệ thống pháp lý EU).

4.5.3. Sự xuất hiện của các đặc tính mới

Việc áp dụng các kỹ thuật sinh học tổng hợp để tạo ra các quá trình trao đổi chất và các mạch kiểm soát mới sẽ dẫn đến các dạng sống khác nhau hoàn toàn về lâu dài. Những sinh vật mới này có thể phát triển các tính chất mới không tiên đoán được. Đáng ngạc nhiên là sự tương tác giữa các mạch mới với các quá trình nội sinh và sự tương tác với các điều kiện môi trường thay đổi mới chỉ được hiểu sơ sài. Chúng ta mới có rất ít kiến thức để cho phép chuyển tiếp các thiết bị gen chứa tối đa 20 gen hoặc các bộ phận sinh học tốt nhất. Quy trình thử và sai sẽ đồng hành lâu dài với sinh học tổng hợp và những đặc điểm bất ngờ chắc chắn sẽ xuất hiện. Những kết quả không lường trước này có thể

gây nguy hiểm nghiêm trọng cho sức khoẻ được minh họa bằng việc sản sinh ra một loại virus mới ở chuột gây nên vô sinh, nhưng không chỉ giết chết tất cả chuột bị nhiễm mà còn 50% nhóm được tiêm chủng - được cho là miễn dịch. Quan sát này ngụ ý rằng có những giới hạn rõ ràng về kiến thức tiên đoán. Tình hình sẽ xấu đi khi xem xét sự kết hợp của nhiều yếu tố hơn từ nhiều nguồn ADN khác nhau.

Điều quan trọng cần lưu ý là hiện nay không ai hiểu được rủi ro mà các sinh vật tổng hợp hoàn toàn sẽ gây ra cho con người, động vật và môi trường, những thông tin nào cần để đánh giá các loại rủi ro này và ai là người chịu trách nhiệm thu thập dữ liệu cần thiết.

KẾT LUẬN

Định nghĩa được sử dụng rộng rãi nhất để mô tả sinh học tổng hợp là thiết kế và xây dựng các bộ phận, thiết bị và hệ thống sinh học mới, hoặc là việc thiết kế lại các hệ sinh học tự nhiên hiện có cho các mục đích hữu ích. Đặc điểm quan trọng trong sinh học tổng hợp là việc áp dụng các nguyên tắc kỹ thuật nhằm mục đích thiết kế và xây dựng các sinh vật với những đặc tính mới lạ chưa có trước đây. Điều này được thực hiện bằng hai cách tiếp cận khác nhau, hoặc là ghép từ ban đầu ("từ dưới lên"), hoặc dựa trên khái niệm bộ gen tối thiểu ("từ trên xuống"). Phương pháp tiếp cận đầu tiên bao gồm các đơn vị kiến tạo cơ bản được lắp ráp từ các mảnh ADN tổng hợp và được sử dụng để thiết kế và chế tạo các thiết bị (nhiều bộ phận với các chức năng được xác định), các đường chuyển hóa và cuối cùng là toàn bộ bộ gen. Một số phương pháp lắp ráp bộ gen tổng hợp đã được phát triển dựa trên tiêu chuẩn hóa các bộ phận để hỗ trợ lắp ráp. Ngược lại, phương pháp đi từ trên xuống nhằm mục đích giảm bộ gen tới bộ gen tối thiểu để duy trì cuộc sống dưới các điều kiện được xác định. Những tế bào tối thiểu này, còn được gọi là "khung" (vật chủ), có chức năng như các nhà máy tế bào nền tảng để các phân tử tổng hợp có thể bổ sung thêm vào.

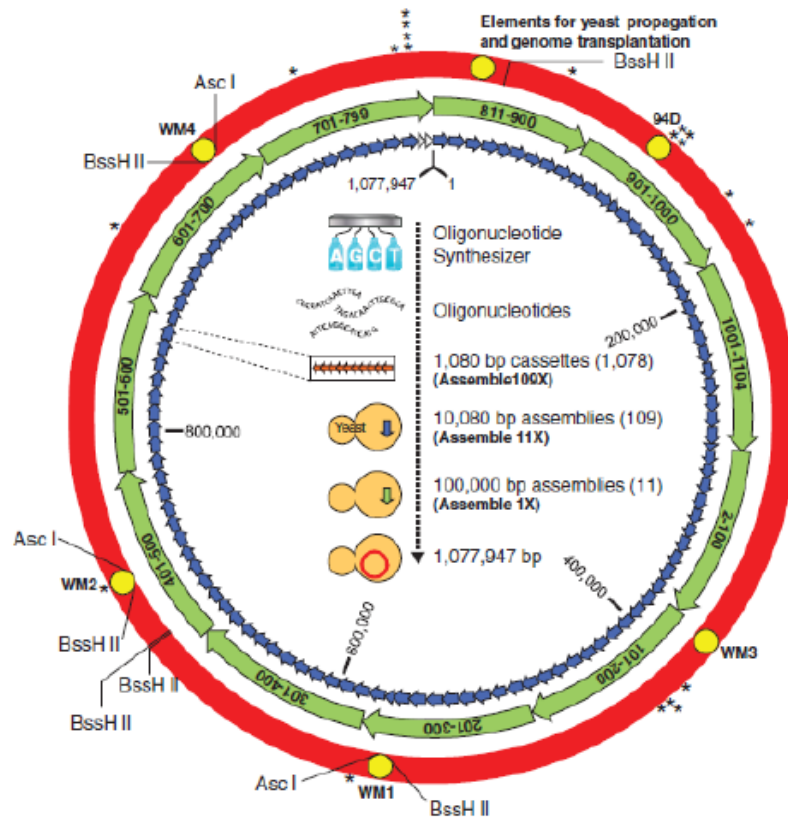
Sinh học tổng hợp trong cây trồng rõ ràng đang tụt hậu so với trong các vi khuẩn. Các phát triển tiên tiến nhất bao gồm sản xuất nhiên liệu sinh học, trong đó xác định các chiến lược có thể trong các giai đoạn phát triển khác nhau. Về lâu dài, sinh học tổng hợp có thể sẽ liên quan đến việc phóng thích vào môi trường các cây trồng ở cấp cao hơn, chủ yếu là để sử dụng trong lĩnh vực năng lượng sinh học.

Các sinh vật được phát triển bởi sinh học tổng hợp dự kiến sẽ khác biệt đáng kể so với các sinh vật đối ứng tự nhiên hiện nay của chúng về đặc tính và sự phù hợp, bao gồm khả năng xâm lấn và chống chịu. Nhiều bất ổn đáng kể vẫn còn đó liên quan đến sự phát triển trong tương lai, do đó cần đánh giá rủi ro và các quy trình quản lý rủi ro ở giai đoạn này.

Biên soạn: Trung tâm Phân tích thông tin

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH:

1. AGES. Synthetic Biology, Final Report. 2014.
2. Agapakis CM, Boyle PM, Silver PA (2012) Natural strategies for the spatial optimization of metabolism in synthetic biology. *Nature chemical biology* 8 (6):527-535. doi:10.1038/nchembio.975
3. Arpino JA, Hancock EJ, Anderson J, Barahona M, Stan GB, Papachristodoulou A, Polizzi K (2013) Tuning the dials of Synthetic Biology. *Microbiology* 159 (Pt 7):1236-1253.
4. Bilgin Bilgin T, Wagner A (2012) Design constraints on a synthetic metabolism. *PloS one* 7 (6):e39903. doi:10.1371/journal.pone.0039903
5. Boyle PM, Silver PA (2012) Parts plus pipes: synthetic biology approaches to metabolic engineering. *Metabolic engineering* 14 (3):223-232. doi:10.1016/j.ymben.2011.10.003
6. Cameron DE, Bashor CJ, Collins JJ (2014) A brief history of synthetic biology. *Nature reviews Microbiology* 12 (5):381-390. doi:10.1038/nrmicro3239
7. EC 2005 Synthetic Biology. Applying Engineering to Biology. Report of a NEST High-Level Expert Group. <http://www.synbiosafe.eu/uploads>
8. EFSA (2011) Guidance of the GMO Panel for risk assessment of food and feed from genetically modified plants.
9. Esvelt KM, Wang HH (2013) Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. *Molecular systems biology* 9:641. doi:10.1038/msb.2012.66
10. Forster AC, Church GM (2006) Towards synthesis of a minimal cell. *Molecular systems biology* 2:45.
11. Harris DC, Jewett MC (2012) Cell-free biology: exploiting the interface between synthetic biology and synthetic chemistry. *Current opinion in biotechnology* 23 (5):672-678.
12. Heinemann M, Panke S (2006) Synthetic biology--putting engineering into biology. *Bioinformatics* 22 (22):2790-2799. doi:10.1093/bioinformatics/btl469
13. iGEM (2014) Registry of Standard Biological Parts: Assembly standard 23. http://parts.igem.org/Assembly_standard_23. Accessed 16.06.2014
14. Kitney R, Freemont P (2012) Synthetic biology - the state of play. *FEBS letters* 586 (15):2029-2036.
15. König H, Frank D, Heil R, Coenen C (2013) Synthetic genomics and synthetic biology applications between hopes and concerns. *Current genomics* 14 (1):11-24.
16. Li Y, Pfeifer BA (2014) Heterologous production of plant-derived isoprenoid products in microbes and the application of metabolic engineering and synthetic biology
17. Montague MG, Lartigue C, Vashee S (2012) Synthetic genomics: potential and limitations. *Current opinion in biotechnology* 23 (5):659-665. doi:10.1016/j.copbio.2012.01.014
18. Moya A, Gil R, Latorre A, Pereto J, Pilar Garcillan-Barcia M, de la Cruz F (2009) Toward minimal bacterial cells: evolution vs. design. *FEMS microbiology reviews* 33 (1):225-235.
19. Nielsen J, Keasling JD (2011) Synergies between synthetic biology and metabolic engineering. *Nature biotechnology* 29 (8):693-695. doi:10.1038/nbt.1937
20. Noireaux V, Maeda YT, Libchaber A (2011) Development of an artificial cell, from self-organization to computation and self-reproduction. *Proceedings of the NAS of the USA* 108
21. Oldham P, Hall S, Burton G (2012) Synthetic biology: mapping the scientific landscape. *PloS one* 7 (4):e34368. doi:10.1371/journal.pone.0034368
22. Porcar M, Pereto J (2012) Are we doing synthetic biology? *Systems and synthetic biology* 6 (3-4)
23. Purnick PE, Weiss R (2009) The second wave of synthetic biology: from modules to systems. *Nature reviews Molecular cell biology* 10 (6):410-422. doi:10.1038/nrm2698
24. SCENIHR, SCCS, SCHER (2014) Synthetic Biology I Definition, Opinion, 25 September, 2014. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_044.pdf.
25. Smith MT, Wilding KM, Hunt JM, Bennett AM, Bundy BC (2014) The emerging age of cell-free synthetic biology. *FEBS letters*. doi:10.1016/j.febslet.2014.05.062
26. Sole et al. (2007) Synthetic protocell biology: from reproduction to computation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 362 (1486)
27. Stephanopoulos (2012) Synthetic biology and metabolic engineering. *ACS synthetic biology* 1 (11):
28. Wang HH (2010) Synthetic genomes for synthetic biology. *Journal of molecular cell biology* 2 (4)
Yadav VG, De Mey M, Lim CG, Ajikumar PK, Stephanopoulos G (2012) The future of metabolic engineering and synthetic biology: towards a systematic practice. *Metabolic engineering* 14 (3)
29. Xu P, Vansiri A, Bhan N, Koffas MA (2012) ePathBrick: a synthetic biology platform for engineering metabolic pathways in *E. coli*. *ACS synthetic biology* 1 (7).



Lắp ráp bộ gen tổng hợp *M. mycoides* trong nấm men.